UNIVERSITY OF HAWAII
LIBRARY

EXPERIENTIA

REVUE MENSUELLE DES SCIENCES PURES ET APPLIQUÉES
MONATSSCHRIFT FÜR DAS GESAMTE GEBIET DER NATURWISSENSCHAFT
RIVISTA MENSILE DI SCIENZE PURE E APPLICATE
MONTHLY JOURNAL OF PURE AND APPLIED SCIENCE

Editores:
P. HUBER · R. MATTHEY · A. v. MURALT · L. RUZICKA
Basel Lausanne Bern Zürich
Redactor: H. MISLIN, Basel-Mainz

BIRKHÄUSER VERLAG BASEL
SUISSE – SCHWEIZ – SVIZZERA – SWITZERLAND

SOMMAIRE - INHALT - SOMMARIO - CONTENTS

Ch. Wunderly: Die Immunoelektrophorese in Agar-Gel 421

Brèves communications - Kurze Mitteilungen - Brevi comunicazioni - Brief Reports

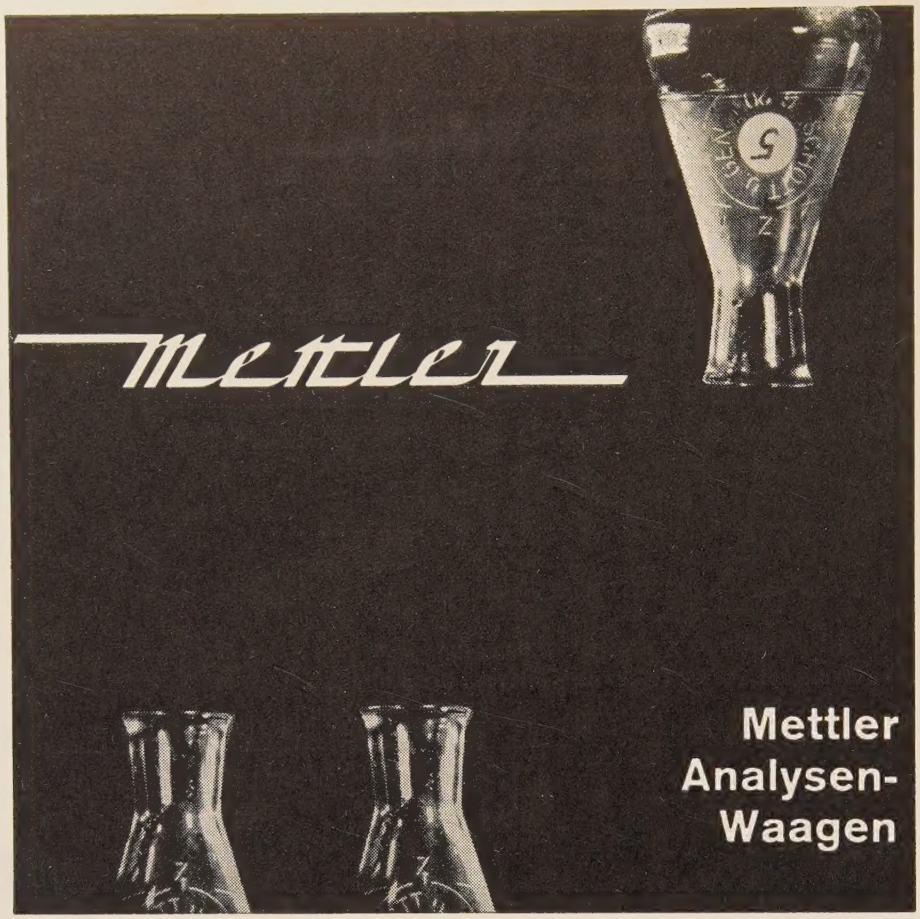
J. Berger, E. R. La Sala, W. E. Scott, B. R. Meltsner, L. H. Sternbach, S. Kaiser, S. Teitel, E. Mach, and M. W. Goldberg: Antibiotics X-948 and X-1008 434
D. Cavallini, B. Mondovi, and C. De Marco: Thiazoline Carboxylic Acid from Formylcysteine 436
K.-B. Augustinsson and G. Jonsson: Biochemical Studies on the Degradation Products of Diazinone 438
V. Rossi, F. Diena, and C. Sacchetti: Demonstration of Specific and Non-specific Agglutinogens in the Normal Bone Marrow Erythroblasts 440
S. Perugini, U. Torelli, and M. Soldati: Differences in the Desoxyribonucleoprotein Complex of Normal and Leukemic Human Lymphocytes 441
N. Ito and S. Grisolia: Muscle Adenylic Deaminase 442
J. Godeaux: Composition du suc de décongélation du muscle strié de la grenouille 443
L. Michelazzi: Inactivation of Catalase by Phospholipide Extracts 444
G. Giebisch, O. Kraupp, B. Pillat und H. Stormann: Die Wirkung der Sulfationen auf das Membranpotential der isoliert durchströmten Säugetiermuskulatur 445
A. Pletscher und K. F. Gey: Über die Wirkung blutzuckersenkender Sulfonylharnstoffe auf das isolierte Rattenzwerchfell 447
I. Grundland, H. Krzywicka et M. Chojnacki: Photolyse ultraviolette et photoréactivation des bactéries-aspects de dépolymérisation et repolymérisation des acides nucléiques bactériens 449
Pro Memoria Carl Neuberg 451
W. I. Taylor: The Biogenesis of the *Tabernanthe Iboga* Alkaloids 454
L. Hulliger, D. W. James, and M. Allgöwer: Hydroxyproline Production in Chick Fibroblast Cultures 454
A. Robert and J. E. Nezamis: Hypertensive Eye Lesions in the Rat. Effect of Carotid Ligation 457
A. S. Kapoor: Sensory Canals of the Head in *Wallagonia attu* (Day) 459
A. G. Sharpe and D. B. Wakefield: The Heat of the Reaction *trans*→*cis* $[Coen_2Cl_2]^+$ in Aqueous Solution (Disputandum) 460
S. L. Kittsley: The Heat of the Reaction *trans*→*cis* $[Coen_2Cl_2]^+$ in Aqueous Solution (A Reply) 460

Nouveaux livres - Buchbesprechungen - Recensioni - Reviews

Proceedings of the Second International Congress on Rheology. Edited by V. G. W. Harrison (Ref. F. Grün) . . . 461
L'évolution de la lithosphère Pétrogenèse. Par H. et G. Termier (Ref. A. Lombard) 461
Bird Navigation. By G. V. T. Matthews (Ref. M. Lüscher) 461
The Physiology of Insect Diapause. By A. D. Lees (Ref. M. Lüscher) 461

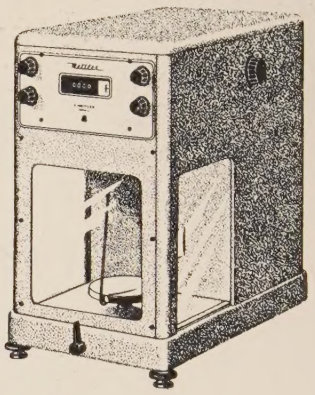
Informations - Informationen - Informazioni - Notes

F. Heim, F. Leuschner und K.-J. Estler: Beziehungen zwischen Funktion und Stoffwechsel des Zentralnervensystems nach Pervitin (Studiorum Progressus) 462



E. Mettler
Pelikanstrasse 19
Zürich

Garantierte
Genauigkeit
Konstante
Empfindlichkeit
Bessere
Reproduzierbarkeit



A 2

Verzeichnis der Inserenten – Liste des annonceurs – List of Advertisers – Experientia XIII/ 11

Birkhäuser AG., Basel
Ciba AG., Basel
Ganz & Co., Zürich
Hirzel-Verlag, Stuttgart
F. Hoffmann - La Roche & Co. AG., Basel
E. Mettler, Zürich
Sandoz AG., Basel
N. Zivy & Cie. S. A., Basel

Die EXPERIENTIA kann in folgenden Ländern durch die Post abonniert werden:
Des abonnements pour EXPERIENTIA peuvent être commandés près des bureaux de poste des pays suivants:

Italien	Belgien, Luxemburg	Dänemark	Schweden	Portugal
Deutschland	Holland	Norwegen	Finnland	Marokko

L'Experientia paraît le 15 de chaque mois. Vente et abonnement dans toutes les librairies suisses et étrangères, ou directement chez l'éditeur. Abonnement pour un an Fr. 44.– pour la Suisse; pour l'étranger Fr. 56.–. Ces prix s'entendent en francs suisses.

Die Experientia erscheint am 15. jedes Monats und kann im In- und Ausland durch jede Buchhandlung oder direkt vom Verlag bezogen werden. Der Abonnementspreis beträgt in der Schweiz Fr. 44.–, im Ausland sFr. 56.–.

Insertionspreise: $^1/_1$ Seite Fr. 220.–, ½ Seite Fr. 132.–, ¼ Seite Fr. 77.–. Inseratenannahme durch den Verlag.

Experientia esce al 15 di ogni mese e può esser richiesta ad ogni libreria svizzera o estera, o anche direttamente alla casa editrice. L'abbonamento annuo è di fr. 44.– per la Svizzera; all'estero sfr. 56.–. I prezzi vanno intesi in valuta svizzera.

Experientia is published on the 15th of every month and can be obtained in any country through the booksellers or from the publishers. The price by annual subscription is sfr. 56.–. Prices in Swiss currency.

Prices for advertising: $^1/_1$ page fr. 220.–, ½ page fr. 132.–, ¼ page fr. 77.–. Advertisements should be sent to the publishers.

© *1957 Birkhäuser Verlag, Basel 10 (Schweiz), Elisabethenstrasse 19, Telephon (061) 235820; Telegrammadresse: Edita Basel*

Printed in Switzerland by Birkhäuser AG., Basel

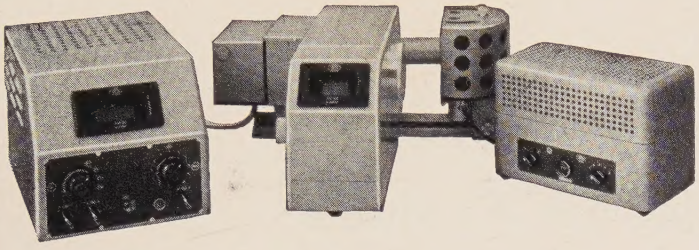
Das neue

ZEISS

Quarz-Spektralphotometer

PMQ II

erfüllt Ihre Wünsche!



Bitte verlangen Sie den ausführlichen Prospekt Nr. 05–657/E

Zuverlässige Beratung und Service durch eigenes Fachpersonal

CARL ZEISS Generalvertretung für die Schweiz:

Beachten Sie die Vorteile:

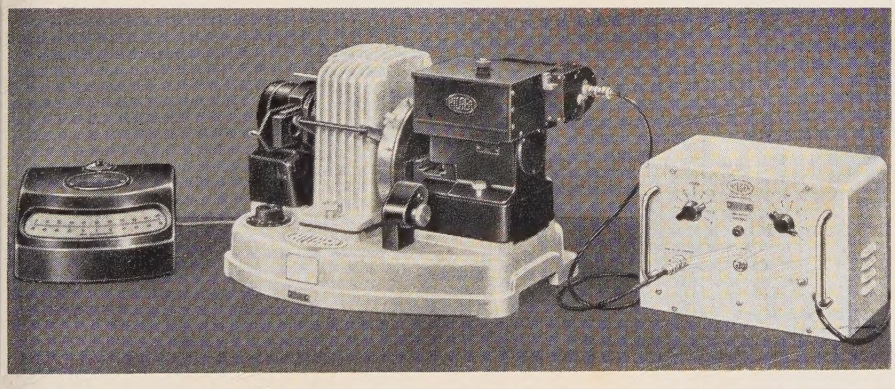
- **Direktanzeige** des Meßwertes (ohne Einbuße an Meßgenauigkeit), dadurch Übersicht über das Absorptionsspektrum und Zeitgewinn.
- **Vollständiger Netzbetrieb.** Keine Akkumulatorwartung; jederzeit betriebsbereit.
- **Impulslicht – Wechselstromverfahren.** Dunkelstromeinstellung fällt weg und ebenso der feuchtigkeitsempfindliche Gleichstromverstärker (keine Trocknungspatronen mehr).
- **Meßbereich:** 200–2500 mμ.
- **Höchste Empfindlichkeit** durch Sekundärelektronen-Vervielfacher 1P28 und PbS-Photo-Widerstand.
- **Einfach-Monochromator** mit Quarz- oder Glasoptik oder **Doppel-Monochromator** mit auswechselbarer Quarz- und Glasoptik nach Wunsch.
- **Mikroküvetten** mit nur 0,2 cm^3 Füllvolumen pro Zentimeter Schichtlänge.
- **Flammen-, Fluoreszenz-, Remissions- und Chromatogrammzusätze.**

GANZ & CO

BAHNHOFSTR. 40
TEL. (051) 23 97 73 *Zürich*

Absorptiometer

HILGER



auch als Fluorimeter (Abbildung) oder Nephelometer verwendbar

Ausserordentliche Genauigkeit. Ablesen der optischen Dichte bis auf 0,002 und Reproduzierbarkeit der Messungen mit gleicher Genauigkeit im gesamten Messbereich. Skala 600 mm Länge mit Dichtebereich von 0–1,3. Lineare Eichung.
Verwendung mit Wolfram-Glühfadenlampe oder, wenn monochromatisches Licht erforderlich, mit Quecksilberdampflampe.
Fluorimeter-Zusatzgerät und separates Fluorimeter-Modell, beide mit Sekundärelektronenvervielfacher und entsprechend hoher Empfindlichkeit.
Direkt ans Netz anzuschliessen. Keine Batterie.
Sofort lieferbar! Verlangen Sie die detaillierten Unterlagen.

Basel, Spalenring 164, Telephon (061) 22 97 86

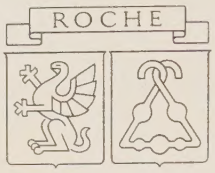
Weitere Erzeugnisse der

HILGER

Spektrographen
Spektrophotometer
Polarimeter
usw.

N. ZIVY & Cie S.A.

*



The confidence and appreciation enjoyed by the products of a pharmaceutical house are not the result of good fortune.

Years of research, experience and progress have given to the medicaments bearing the name 'Roche' the quality for which they are known and the recognition generally accorded them.

ROCHE

F. HOFFMANN-LA ROCHE & CO · LTD · BASLE · SWITZERLAND

EXPERIENTIA

Vol. XIII - Fasc. 11 Pag. 421–464 15. XI. 1957

Die Immunoelektrophorese in Agar-Gel

Methode und Ergebnisse

Von Ch. Wunderly*

Einleitung. Die Geschichte der Naturwissenschaft zeigt uns, wie die Gedanken zu neuen Messmöglichkeiten sich manchmal zu einer oder zwei Arbeiten verdichten und darauf wieder für Jahrzehnte in Vergessenheit geraten. So blieb der Nachweis von Autoantikörpern, wie ihn Widal[1] und Chauffard[2] bereits 1908 beschrieben hatten, für 30 Jahre unbenützt. Obwohl in diesen frühen Arbeiten genau unterschieden wurde zwischen Autohämolyse und Autoagglutination einerseits sowie Isohämolyse und Isoagglutination andererseits, betrachteten Autoren[3] 1937/1938 den Nachweis von Autoagglutination als erstmalig. Ähnlich blieben die Arbeiten von König[4], der schon 1939 Papier als Trägermedium für die elektrophoretische Trennung von Farbgemischen benutzt hatte, unbeachtet. Erst als die analytische Chemie begann, auch makromolekulare Stoffgemische vermehrt in den Kreis der Betrachtung zu ziehen, erkannten etwa gleichzeitig Durrum[5], Cremer und Tiselius[6], Turba und Enenkel[7] sowie Grassman und Hannig[8] die bedeutenden Möglichkeiten dieser Methode. Wesentlich früher, nämlich 1907, hatten bereits Field und Teague[9] in einem U-Rohr, das mit Agar-Gel gefüllt war, Diphterietoxin und Antitoxin elektrophoretisch getrennt. Darauf blieb die Methode unbenützt, bis ihr Gordon[10] 1949 eine neue Form der Ausführung gab. Bereits 1905 war von mehreren Autoren[11] gezeigt worden, wie die Beobachtung des interzonalen Präzipitintestes oder des «Ringtestes» erleichtert wird durch die Stabilisierung in Gelen. So benützten Nicolle, Cesari und Debains[12] 1920 Gelatine-Gel, um der raschen Auflösung von spezifischem Präzipitat in Antigen-Überschuss entgegenzuwirken. Oudin[13] zeigte 1946, wie im Reagenzglas, gefüllt mit glasklarem Agar-Gel, als Folge der *einfachen Diffusion* die Präzipitatbildung zwischen Antigen und Antikörper nach Massgabe von Konzentration und Diffusionskoeffizient gut zu beobachten ist. Die etwa gleichzeitig entwickelte Plattenmethode mit *doppelter Diffusion* von Ouchterlony[14] sowie die Arbeiten von Elek[15] gaben dieser Methode eine Ausführungsform[16], welche heute als Agardiffusionstest eine zunehmende Verwendung findet[17], da sie nicht nur die Zahl der Antigene bestimmen lässt, sondern auch den Vergleich verschiedener Antigenlösungen zulässt.

Der Agardiffusionstest. Durch die Bildung von Präzipitatlinien gibt die Diffusionsplatte zu erkennen, wie viel serologisch aktive Substanzen in Antigenen oder auch in Extrakten von Mikroorganismen gegen ein bekanntes Antiserum vorhanden sind. Dazu werden in das Agar-Gel 3–5 Vertiefungen ausgestanzt und die Sera hineinpipettiert. Zumeist befindet sich das Antiserum in zentraler Stellung. Sind in mehreren Sera dieselben löslichen Antigene enthalten, so fliessen die Präzipitatlinien ineinander über, während die Linien völlig verschiedener Antigene einander kreuzen. Dieses Unterscheidungsmerkmal ist der hauptsächliche Fortschritt der Ouchterlony-Technik[18]. Das Gel übt auf die

* Medizinische Universitätsklinik, Zürich.

[1] F. Widal, P. Abrami und M. Brulé, Arch. Mal. Cœur *1*, 193 (1908).

[2] A. Chauffard und J. Troisier, Sem. médicale *28*, 345 (1908).

[3] A. Giordano und L. Blum, Amer. J. med. Sci. *194*, 311 (1937). – I. Davidson, Amer. clin. Path. *24*, 1333 (1954). – H. Greenwald, Amer. J. med. Sci. *196*, 179 (1938).

[4] P. König, Actas III. Congr. Sud-Americ. chimica *2*, 334 (1937). – D. v. Klobusitzky und P. König, Arch. exper. Path. Pharmak. *192*, 271 (1939).

[5] E. Durrum, J. Amer. chem. Soc. *72*, 2943 (1950).

[6] D. Cremer und A. Tiselius, Biochem. Z. *320*, 273 (1950).

[7] F. Turba und H. Enenkel, Naturwiss. *37*, 93 (1950).

[8] W. Grassman und K. Hannig, Naturwiss. *37*, 496 (1950).

[9] C. W. Field und O. Teague, J. exper. Med. *9*, 86, 225 (1907).

[10] A. Gordon, B. Keil und K. Sebesta, Nature *146*, 499 (1949). – A. Gordon, B. Keil, K. Sebesta, P. Knessl und F. Sorm, Coll. Trav. chim. Tchécosl. *15*, 1 (1950).

[11] H. Bechhold, Z. phys. Chem. *52*, 185 (1905).

[12] M. Nicolle, E. Cesari und S. Debains, Ann. Inst. Pasteur *34*, 149 (1920).

[13] J. Oudin, C. R. Acad. Sci. Paris *222*, 115 (1946); *228*, 1890 (1949); Methods med. Res. *5*, 335 (1952).

[14] O. Ouchterlony, Acta path. microbiol. scand. *26*, 507, 516 (1949); Ark. Kemi *26 B*, 1, 43, 55 (1949).

[15] S. Elek, Brit. J. exper. Pathol. *30*, 484 (1949).

[16] O. Ouchterlony, H. Ericsson und C. Neumüller, Acta med. scand. *138*, 76 (1950).

[17] C. Schiott, Acta path. microbiol. scand. *32*, 251 (1953). – H. E. Schultze, Z. Elektrochem. *60*, 262 (1956). – P. Burtin, Bull. Soc. Chim. biol. *36*, 335 (1954). – H. Seeliger, Z. Hygiene *141*, 110 (1955). – H. Seeliger und G. Linzenmeier, Z. Hygiene *136*, 355 (1953). – P. Gell, J. clin. Pathol. *8*, 269 (1955). – P. Grabar, Bull. Soc. Chim. biol. *36*, 65 (1954). – P. Grabar, M. Seligmann und J. Bernard, Ann. Inst. Pasteur *88*, 548 (1955). – L. Korngold und R. Lipari, Cancer *9*, 183, 262 (1956). – R. Augustin, Quart. Rev. Allergy *9*, 504 (1955).

[18] O. Ouchterlony *et al.*, Acta med. scand. *138*, 76 (1950). – Vgl. P. Gell, J. clin. Pathol. *8*, 269 (1955).

Diffusion der Proteinmoleküle eine verzögernde Wirkung aus, so dass die Werte der Svedbergschen Diffusionsgleichung nicht ganz erreicht werden[18]. Als Standardvergleich verwendet man mit Vorteil solche Proteine, deren *antigene Natur homogen* ist. Unter den menschlichen Serumproteinen sind es das *Albumin*, einzelne Bestandteile des *γ-Globulin*, die *Haptoglobin*-Komponenten, sowie das *Siderophilin*, welche in einer immunologisch hinreichenden Reinheit isoliert sind. Diese hochgereinigten Serumanteile ermöglichen beispielsweise in der «Ouchterlony-Petrischale» den Vergleich ihrer antigenen Eigenschaften mit dem Serumalbumin bei *Lipoidnephrose*[19] oder *Hepatopathien*[20]. Ebenso hat sich der Agar-Diffusionstest beim Studium der Toxin-Antitoxinreaktionen bewährt, sowie bei der Reinheitsprüfung von isolierten Toxinpräparaten und Toxoiden, bei der Wertigkeitsbestimmung antitoxischer Seren und der Rezeptorenanalyse. Der Diffusionsplattentest wurde soweit verfeinert, dass bei der Prüfung antitoxischer Sera Rezeptoren gegen Nährbodenbestandteile nachweisbar wurden[21], die selbst antigene Wirksamkeit besassen. Lösliche Antigene[22], welche ein Gemisch mehrerer Teilkomponenten darstellen, besitzen im Agar-Gel eine unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeit und geben dadurch mit homologen Antikörperfraktionen getrennte Präzipitatlinien[23]. Um zu einer sicheren Trennung zu gelangen, ist es freilich notwendig, die Antigenkonzentration in ein optimales Verhältnis zur Menge der Serumantikörper zu bringen. Die Deutung einer Mehrzahl von Typen- und Gruppenantigenen hat eine grosse Zahl vergleichender Untersuchungen an bekannten Stämmen und absorbierten Seren zur Voraussetzung; auch ist der Einfluss unspezifischer Verunreinigungen des Antigens auf den Ablauf der serologischen Reaktion oft schwer abzuschätzen. Ein Hauptvorteil liegt in der grossen Kombinationsmöglichkeit und der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse; ferner ist der Arbeitsaufwand kleiner als bei der quantitativ geleiteten Ausführung der Präzipitin-Reaktion[24]. An Empfindlichkeit und Spezifität der Aussage übertrifft sie jede rein physikalisch-chemische Methode. Nehmen wir als Beispiel die *freie Elektrophorese*, in welcher Proteinsole von 1% untersucht werden, dann braucht es mindestens 5% des Gesamtproteins (etwa 14 mg), um einen eigenen Gradienten zu bilden, der messbar ist[25]. Die Mikroausführungen der freien Elektrophorese (KERN, ANTWEILER) haben die notwendige Serummenge seither auf 0,1 ml herabgemindert. Die *Empfindlichkeit* ist somit von ganz anderer Grössenordnung, denn für die *Präzipitation im Agar-Gel werden etwa 0,002–0,001 mg Antigen* benötigt und für seine quantitative Bestimmung[26] nach der Methode von FOLIN gar nur etwa 0,008 mg. Es war die Hyperimmunisation des Pferdes notwendig, um mit freier Elektrophorese im Diphterie- oder Tetanusserum eine neue Proteinkomponente *T* entstehen zu lassen[27]. Sie zeigt eine elektrophoretische Beweglichkeit zwischen der von normalem *β*- und *γ*-Globulin[28]. Beim erwachsenen Menschen wandern die im Verlaufe manifester oder okkulter Infektionen gebildeten Antikörper nahezu ausschliesslich mit der Beweglichkeit von normalem *γ*-Globulin[29]. Es gelang weder mit chemischen Methoden (Aminosäure-Analyse) noch mit physikalisch-chemischen (Ultrazentrifugation, Diffusion, Ultraviolettabsorption) einen Unterschied messbar zu machen zwischen normalem *γ*-Globulin und Antikörperglobulin. Bisherige Ergebnisse mit Endgruppenanalyse sind noch uneinheitlich in ihren Schlussfolgerungen. Auch die Auftrennung spezifischer Präzipitate in freier Elektrophorese[30] führte nicht wesentlich weiter, denn dessen Zusammensetzung ist abhängig von der Konzentration der reagierenden Komponenten und folgt keiner stöchiometrischen Gesetzmässigkeit.

I. *Voraussetzung für die Immunoelektrophorese* (*Prinzip der Methode*). Wenn so die Elektrophoresetechnik der Serologie vorerst keinen wesentlichen Fortschritt brachte, so änderten sich die Messmöglichkeiten nachhaltig, als GRABAR und WILLIAMS[31] 1953 die Kombination von Elektrophorese und serologischer Präzipitation in Agar-Gel verwirklichten. Nachfolgend sei kurz das *Prinzip der Methode* dargelegt. Das zu trennende Proteingemisch (Serum, Liquor cerebros. Lymphe, Ascites u.a.) wird im Agar-Gel der Elektrophorese unterworfen. Nach hinlänglicher Auftrennung der Fraktionen wird in eine Vertiefung des Agar-Gel, welche längs der Wanderungsrichtung der Proteine verläuft, entsprechendes Antiserum einfliessen gelassen. Dasselbe diffundiert allmählich seitlich zu den Proteinfraktionen. An jenen Stellen, wo Antigene und ihre spezifischen Antikörper zusammentreffen, bilden sich leicht gekrümmte Präzipitatlinien. *Das Ergebnis zeitigt serologisch eine verfeinerte Antigenanalyse und physikalisch-chemisch die Charakterisierung der einzelnen Komponenten auf Grund ihrer Wanderungsge-*

[19] P. BURTIN und P. GRABAR, Sem. Hôp. Paris *30*, 1 (1954).
[20] P. BURTIN, Bull. Soc. Chim. biol. *36*, 1021 (1954).
[21] R. JENNINGS, J. Immunol. *70*, 181 (1953); J. Bact. *67*, 559, 565 (1953).
[22] C. POPE, M. STEVENS, E. CASPARY und E. FENTON, Brit. J. exper. Pathol. *32*, 246 (1951).
[23] O. OUCHTERLONY, Acta path. microbiol. scand. *32*, 231 (1953).
[24] M. HEIDELBERGER, *Serological approaches to studies of Protein structure and metabolism* (Rudgers Univ. Press, 1954).
[25] E. KABAT und M. MAYER, *Experimental Immunochemistry* (Springfield, USA. 1948).
[26] P. GRABAR, V. Kongr. Int. Microbiol. Rom *1953*, 169.
[27] V. D. SCHEER, R. WICKOFF und F. H. CLARKE, J. Immunol. *39*, 65 (1940).
[28] E. L. SMITH, J. biol. Chem. *164*, 345 (1946). – E. L. SMITH und D. BROWN, J. biol. Chem. *183*, 241 (1950).
[29] B. JAGER, E. SMITH, M. NICKERSON und D. BROWN, J. biol. Chem. *176*, 1177 (1948).
[30] E. KABAT und J. MURRAY, J. biol. Chem. *182*, 251 (1950). – M. COHN, H. DEUTSCH und L. WETTER, J. Immunol. *64*, 381 (1950). – B. JAGER und C. GUBLER, J. Immunol. *69*, 311 (1952).
[31] P. GRABAR und C. WILLIAMS, Biochim. biophys. Acta *10*, 193 (1953); *17*, 67 (1955).

schwindigkeit. Die Voraussetzung war ein Angleichen der Proteinkonzentration bei Elektrophorese und serologischer Reaktion. Wie oben gezeigt wurde, ist dieselbe in der Tiselius-Ausführung der Elektrophorese wesentlich höher, als es die Präzipitation erfordert. Diese letztere erlaubt aber nur eine geringe Variationsbreite in der Konzentration der beiden Komponenten, ansonst Fällungen entstehen können, die sich im Überschuss der Reagenzien lösen. Die Angleichung der Gehalte musste infolgedessen in erster Linie von der elektrophoretischen Seite aus erfolgen. Hier war es von entscheidendem Vorteil, dass für die Auftrennung der Serumproteine im Agar nicht mehr als 700–800 μg benötigt werden. Damit verbleibt für eine einzelne Globulinfraktion 70–100 μg; diese befinden sich in der 2 mm dicken Agarschicht über eine Fläche von 180 bis 630 mm^2 ausgebreitet, so dass in den Randzonen der zugehörigen Bezirke optimale Verdünnungen der Proteine vorliegen. Auf Grund ihrer rascheren Diffusion verbreitet sich die Albuminfraktion im Agar-Gel über eine grössere Fläche; dadurch wird ihre höhere Ausgangskonzentration etwas ausgeglichen. Entsprechen die gegenseitigen Verhältnisse denjenigen der «equivalence zone», so können auf diesem Wege noch 3 μg Albumin und 4–5 μg Globulin sichtbar gemacht werden. Darin kommt die ausserordentliche *Steigerung der Empfindlichkeit* zum Ausdruck, wie sie durch die Kombination mit *der serologischen Reaktion* möglich wird. Ist die elektrophoretische Auftrennung beendet, so lässt man in längsseitige Aussparungen des Agar-Gels das Antiserum einfliessen. Bei einem hochtitrigen Pferdeserum braucht es davon 0,05 ml, da es mit ebensoviel physiologischer Kochsalzlösung verdünnt werden kann. Die zeitliche Beanspruchung folgt dem verschieden raschen Reaktionsablauf, indem für die Elektrophorese 4–5 h genügen, während die anschliessende Diffusion des Antiserums bei 18°C 2–3 Tage erfordert (Mikromethode[32], s. vorn).

Theoretische Grundlagen. Es gehört zu den Erfordernissen der Immunoelektrophorese, dass die aufgetrennten Proteinfronten stabilisiert sind. Wenn sich Agar-Gel als Trägermilieu bisher am besten bewährte, so liegt es an der losen, überaus weitmaschigen Textur dieses Gels. Es konnte gezeigt werden, dass der «freie Raum» eines 1%-Agar-Gel nahezu die Gegebenheiten der freien Lösung erreicht[33]. Bei hochgereinigtem Agar ist ein 1%-Sol für die Gelbildung ausreichend. Im Stärkeblock (Kartoffelstärke) erreicht der «freie Raum» etwa 40% der Säulenlänge[34]. Noch ungünstiger liegen die Verhältnisse im Papier, wo der vom Proteinteilchen zurückgelegte Weg eine vielfach gewundene Strecke bedeutet. Die Adsorption der Proteinteilchen an der Zellulose wird dadurch begünstigt und verursacht die nachziehenden «Schleppen»[35]. Im Agar-Gel dagegen gelangt ein Protein nach Umkehren der Stromrichtung quantitativ wieder an seinen Ausgangspunkt zurück. An den meisten Medien mit dichter Textur spielen die Sorptionsverhältnisse eine wesentliche Rolle für die elektrophoretische Auftrennung. Für die Differenzierung der verschiedenen Arten von Hämoglobin ist deren Adhäsion an der Zellulose eine Voraussetzung[36].

So haften im Papier vom vorauswandernden Albumin stets Spuren längs seiner Bahn[37]; da es sich nur um Mengen handelt, welche unter der methodischen Fehlerbreite liegen, beeinträchtigen sie die quantitative Auswertung kaum; dagegen würde es für die Immunoelektrophorese, mit ihrer gesteigerten Empfindlichkeit, eine unklare Ausgangslage schaffen. Wenn somit bei der Elektrophorese in Agar-Gel β- und γ-Globulin wegen der starken elektroosmotischen Strömung kationisch wandern, so gewährleistet dieser sekundäre Effekt eine besonders saubere Auftrennung. *Hier überlagert sich, der elektrophoretischen Trennwirkung etwa ebenbürtig in der Wirkung, der elektroosmotische Effekt* (siehe folgenden Abschnitt).

Für das Ergebnis ist es von besonderer Wichtigkeit, dass bei der serologischen Reaktion von Antigen und Antigenkörper im Agar-Gel beide Komponenten möglichst im optimalen Gehalt vorhanden sind. Denn das spezifische Präzipitat ist immer löslich in einem Überschuss von Antigen und oft ebenfalls in einem Überschuss von Antikörper (Immunserum vom Pferd). Im idealen Konzentrationsverhältnis ist kein Überschuss vorhanden, weshalb dieser Bereich als «equivalence zone» bezeichnet wird. Die Zone ist um so enger umschrieben, je grösser die Reinheit des betreffenden Antigens ist. Sie ist ferner mit Immunsera vom Pferd besonders scharf definiert, während Kaninchen-Antisera im Agar-Gel einseitig scharf begrenzt sind, jedoch rückwärtig Trübungen erkennen lassen, welche Anlass zu Verschleierungen bieten können. Besteht das Antigen aus einem Polysaccharid, so sind die Präzipitatlinien zumeist unscharf. Die einfachen Diffusionsverhältnisse von Proteinen im Agar-Gel wurden von OUDIN[13] und BECKER *et al.*[38], die doppelte Diffusion dagegen von SALVINIEN[39] auch in ihren quantitativen Belangen eingehend untersucht. Es ergab sich, dass das Vorrücken x der Proteinfront den Diffusionsgesetzen gehorcht und zur Zeit t die einfache Abhängigkeit besteht:

[32] J. SCHEIDEGGER, Int. Arch. Allergy *7*, 103 (1955); Sem. Hôp. Paris *1956*, 2119.

[33] J. LLOYD und A. SHORE, *Chemistry of the Proteins* (London 1938). – E. BECKER, J. MUNOZ, C. LAPRESLE und L. LE BEAU, J. Immunol. *67*, 501 (1951).

[34] A. BUSSARD und D. PERRIN, J. Lab. clin. Med. *46*, 689 (1955). – A. BUSSARD, C. R. Acad. Sci. Paris *239*, 1702 (1954).

[35] E. KLEIN, H. HÜNER und F. FRANKEN, Dtsch. med. Wschr. *81*, 1793 (1956).

[36] H. LEHMANN und E. B. SMITH, Amer. J. clin. Path. *26*, 1270 (1956). – A. SAHA, R. DUTTA und J. GHOSH, Science *125*, 447 (1957).

[37] D. KRAFT und H. BIEL, Ärztl. Labor *2*, 397 (1956).

[38] E. L. BECKER, J. MUNOZ, C. LAPRESLE und L. LE BEAU, J. Immunol. *67*, 501 (1951).

[39] J. SALVINIEN, J. Chim. phys. *52*, 741 (1955).

$$\frac{x}{\sqrt{t}} = k .$$

Die Konzentration C_{Ar} des Antikörpers im Agar-Gel ist gering gegenüber der Konzentration C_{An} des Antigens in der Lösung, wodurch diese eindringt in die Zone des Antikörpers. Die Geschwindigkeit, mit welcher dies geschieht, ist proportional dem Logarithmus der Antigenkonzentration. Sind mehrere Antigene gleichzeitig vorhanden, so entspricht jedem eine Konstante k. Kennt man C_{Ar} und C_{An} und wird k experimentell bestimmt, dann kann die Diffusionskonstante D für das betreffende Antigen berechnet werden.

Ist die Antigenkonzentration ungenügend, um den Äquivalenzpunkt zu erreichen, dann bilden sich keine Präzipitatlinien. Ebenso kennt man Fälle, wo mit dem Verdünnen des Immunserums neue Linien auftauchten. Manchmal ergibt sich bei Antigenüberschuss, seltener bei Antikörperüberschuss, eine unspezifische Verdoppelung der Linien; solche Linien überschneiden sich an den Enden des Kreissegmentes, während parallele Linien ohne Schnittpunkte zwei unabhängige Antigene anzeigen. In Fällen von Antigengemischen ist deshalb die experimentelle Variation der Gehalte angezeigt[40]. OUDIN hat den Satz geprägt: *Die Anzahl antigener Komponenten ist mindestens gleich gross wie die Zahl sichtbarer Präzipitatlinien.* Diese Beobachtungen gelten allgemein für die Diffusion serologisch aktiver Proteine in Agar-Gel.

Die Elektroosmose. Die Erscheinung der Elektroosmose wird von DARMOIS[41] als eine Folge der verschiedenen Hydratation der Ionen erklärt, indem die positiv geladenen Ionen im allgemeinen stärker hydratisiert sind als die negativ geladenen. Infolge ihres kleineren Wassermantels sind die letzteren eher befähigt, die positiv geladenen Seitenketten eines Makromoleküls zu entladen; auch wird dadurch die Flüssigkeitsbewegung in der Richtung der Kathode verständlich. Ferner kann die schwache negative Ladung, welche das Agar-Gel-Gerüst gegenüber der Pufferflüssigkeit annimmt, nur von untergeordneter Bedeutung sein. Der Umfang der Elektroosmose kann auf Grund der Bewegung ungeladener und nichtadsorbierter Testsubstanzen verfolgt werden; als solche wurden H_2O_2, Formaldehyd, Thioazetamid, Allylthioharnstoff, Hydrochinon, *o*-Nitranilin, Dextran, Xylose und Glukose vorgeschlagen. Die Erfahrung zeigte uns, dass Dextran intravenous clinical, mit einem Molekulargewicht von 80000 ± 10000, sich gut dafür eignet, um aus der zurückgelegten Distanz eine Bewertung der Wanderungsgeschwindigkeit zu ermöglichen.

Für die Ortsbestimmung projiziert man die vergrösserten Präzipitatlinien auf ein Millimeterpapier und ermittelt den Schnittpunkt der Tangente. Vergleicht man damit die Werte, wie sie CHRESTFIELD und ALLEN[42] bei Papier-Elektrophorese mit Koffein bestimmt haben, so zeigt sich die ungleich dichtere Textur der Zellulose, welche der Elektroosmose einen beträchtlichen Widerstand bietet. Es folgt, dass die beiden elektrokinetischen Erscheinungen, *Elektrophorese* und *Elektroosmose*, in hohem Masse *abhängig sind von den Eigenschaften des Trägermediums* (Kalziumgehalt des Agar-Gel usw.).

Ähnlich wie im *Pektin-Gel* ist auch im *Agar-Gel* die *feste und flüssige Phase kontinuierlich*, das heisst das feste Gerüst dieser Gele gleicht eher einem Schwamm als Honigwaben. Wie ungehindert die elektrophoretische Beweglichkeit von verschiedenen ungeladenen Molekülen in einem 1,25%-Agar-Gel ist, zeigt der folgende Vergleich[43]. Das Polysaccharid Levan mit dem Molekulargewicht 10000 wandert ebenso rasch wie Glukose und nahezu wie γ-Globulin, Molekulargewicht 170000. So erstaunt es nicht, dass auch die relativen Beweglichkeiten der Proteinfraktionen des menschlichen Serums dieselben Werte erreichen, wie sie in der freien Elektrophorese gemessen wurden[43], nämlich

für $\frac{\text{Alb}}{\alpha_1}$ = 1,2 in 1,25%-Agar-Gel wie auch im Tiselius-Apparat,

für $\frac{\text{Alb}}{\alpha_2}$ = 1,5 beidseits und

für $\frac{\text{Alb}}{\beta}$ = 2,1 gegen 2,2.

Leitfähigkeit, Evaporation und Feldstärke. Die Leitfähigkeit von gepuffertem Agar-Gel ist nahezu dieselbe wie im verwendeten Puffersystem; in einem 1%-Agar-Gel mit Barbitursäurepuffer vom pH 8,6 und $\mu = 0{,}05$ verhält sich die Leitfähigkeit wie 32 zu 29 im Puffer[43]; in einem 1,25%-Agar-Gel und demselben Puffersystem mit pH = 8,6 und $\mu = 0{,}1$ sind die Zahlen 64 und 60. Mit geringerer Ionenstärke des Puffersystems nimmt die Wanderungsgeschwindigkeit der zu trennenden Proteine mehr zu als linear. Eine Pufferung von der Ionenstärke $\mu = 0{,}055$ ist die untere Grenze, indem bei noch kleineren Ionenstärken sich Bereiche von verändertem pH ergeben, demzufolge die Fronten der Proteinfraktionen eine verzerrte Form annehmen. Bei einer Ionenstärke von 0,05 kann auch die Stromstärke hinreichend niedrig gehalten werden, so dass nachteilige Wirkungen der Stromwärme nicht zu erwarten sind. Beträgt nämlich die Feldstärke 6 V/cm, so erwärmt sich das Agar-Gel bereits mehrere Grade über Zimmertemperatur[43] und der Gewichtsverlust durch Evapora-

[40] E. L. BECKER, J. MUNOZ, C. LAPRESLE und L. LE BEAU, J. Immunol. *67*, 501 (1951). – J. SALVINIEN, J. Chim. phys. *52*, 741 (1955). – H. RUBINSTEIN, J. Immunol. *73*, 322 (1954). – C. WILLIAMS und P. GRABAR, J. Immunol. *74*, 158, 397, 404 (1955).

[41] E. DARMOIS, C. R. Acad. Sci. Paris *227*, 339 (1948).

[42] A. CHRESTFIELD und F. W. ALLEN, Analyt. Chem. *27*, 422 (1955).

[43] P. BURTIN, Rev. int. Hépat. *4*, 641 (1954).

tion steigt auf 18% bei einer Versuchsdauer von 150 min. Beträgt die Feldstärke hingegen 5 V/cm bei einer Klemmspannung von 85 V Gleichstrom (siehe Angaben zur Technik), so sind besondere Kühlvorrichtungen überflüssig und es kann darauf verzichtet werden, in feuchter Kammer zu arbeiten. Evaporation und Leitfähigkeit bleiben während des ganzen Versuches nahezu konstant, so dass auch die Wanderungsgeschwindigkeit nicht abnimmt und *die Weglänge* (Trennstrecke) in erster Linie *abhängig wird von der Versuchsdauer*. Die Bedingungen sind somit grundlegend verschieden von jenen der Papier-Elektrophorese (MACHEBOEUF[44]), wo jedes Proteinion unabhängig von der Auftragstelle schliesslich eine bestimmte Stelle auf dem Papierstreifen einnimmt. Für die *Immunoelektrophorese* hat eine *längere Trennstrecke* den Vorteil, dass die einzelnen Präzipitationslinien besser in ihrem Verlauf und gegenseitigen Verhalten zu verfolgen sind. Die Erleichterung der Deutung des Ergebnisses ist hier wichtiger als die Versuchsdauer.

Kolloidchemie des Agar-Gel. Agar-Agar wird gewonnen aus den Florideenmembranen der Gelidium- und Gracilariaarten. Es ist ein lineares Polysaccharid[45], dessen Untereinheiten aus 9 D-Galaktose-Resten bestehen, welche in 1,3-glykosidischer Bindung verknüpft sind[46]. Nebenvalenzbindungen halten die Makromoleküle zum Gelnetz zusammen. Bei Temperaturerhöhung werden diese labilen Sekundärvalenzen leicht gelöst und das Gel verflüssigt sich. Es entsteht mit heissem Wasser ein stabiles, lyophiles Hydrosol. Agar-Gel ist thermoreversibel; so sind seine Erweichungsprodukte vor und nach dem Gefrieren nicht verschieden, während Pektin-Gele sich nach dem Gefrieren verflüssigen. Für die Schwellung des Agar-Gels sind die polaren Gruppen, wie —COOH, —OH und > C=O, als Hydratationszentren wichtig. Sie werden durch Salzionen abgeschirmt, so dass Agar in jedwelcher Salzlösung weniger schwillt als wie in Wasser. Beim *Gelierprozess* steigt die Viskosität kurz vor der Ausbildung zum Gel stark an als *Ausdruck für die zunehmende Vernetzung der Makromoleküle*. Weitere Eigenschaften verändern sich jedoch bei der erfolgten Sol/Gel-Umwandlung nicht sprunghaft; so ändern sich Diffusion, elektrische Leitfähigkeit und die Dielektrizitätskonstante nicht wesentlich. Agar-Gel ist ausgezeichnet durch einen hohen Elastizitätsmodul und eine relativ geringe Verformbarkeit[47]. In einer Reihe von Gelen gleichen Elastizitätsmoduls würde die Zerreissfestigkeit in folgender Reihe zunehmen: Agar-Gel < Gelatine-Gel < Polyvinylalkohol-Gel < Pektin-Gel < Tamarindenschleim-Gel. Daraus leitet sich ab, dass die mittlere Länge der Fadenmoleküle im Pektin-Gel grösser ist als im Agar-Gel. In der Tat gelingt die Ausführung der Elektrophorese noch gut in einem *Pektin-Gel*[48] von nur 0,5%. Die wässerige Phase macht hier somit 99,5% bis 99,8% aus! Die Gelierung wird durch Pektin-methyl-esterase bei Raumtemperatur und in Anwesenheit von Kalziumionen erreicht[48]. Darin können Substanzen aufgetrennt werden wie Lysozym, die mit Agar Niederschläge bilden. Das Pektingerüst kann hinterher durch Pektinesterase unter Abspaltung von Methanol hydrolysiert werden[49]; dadurch kann eine Elution oder Extraktion der Proteine aus bestimmten Bezirken umgangen werden[50].

Praktische Angaben zur Technik. a) *Die Vorbereitung des Agar-Gels.* Um gleichmässige Resultate zu erhalten, ist es vorteilhaft, sich stets derselben Marke von Agar, wie etwa Bacto-Agar der Firma Difco, zu bedienen. Von dieser werden 3 g in einem Weithals-Erlenmeyer-Kolben eingewogen und mit 20 ml destilliertem Wasser erst gut angerührt und zur Quellung gebracht; später werden unter allmählichem Erhitzen und gutem Rühren 180 ml Pufferflüssigkeit zugegeben. Wenn das Agar-Sol völlig homogen ist, filtriert man warm durch ein Nylonfiltertuch und bringt das Filtrat mit Puffer auf 200 ml. Von dem warmen Agar-Sol von 1½% werden in trockene Reagenzgläschen je 11 ml pipettiert und auf die erstarrende Oberfläche 2 Tropfen einer 5%-Merthiolatlösung gegeben. Nach dem Verkorken werden die Gläschen kühl und dunkel beiseitegestellt. Für den Puffer werden 29,34 g diäthylbarbitursaures Na, 19,42 g Na-Azetat und 180 ml 0,1 *n* HCl ad 3 l Wasser gelöst. Es ergibt sich ein pH von 8,6 bei einer Ionenstärke von 0,1. Als Unterlage für das Agar-Gel ist es vorteilhaft, die 16 × 4 cm Glasplättchen zu verwenden, die im Elphor-Auswertgerät dazu dienen, den transparentgemachten Papierstreifen einzulegen. Die Glasplättchen werden erst mit 96% Alkohol abgespült, auf einer Heizplatte erwärmt und einige Tropfen Agar-Sol auf ihrer Oberfläche verstrichen. Nach dem Eindunsten entnimmt man mit vorgewärmter Stabpipette einem der erwähnten Agar-Röhrchen 10 ml Agar-Sol (vgl. WUNDERLY und BUSTAMANTE[51]). Man richtet die Spitze der Pipette auf die Mitte des horizontal gelegten, heissen Glasplättchens und regelt die Ausflussgeschwindigkeit so, dass das Agar-Sol sich nach allen Seiten gleichmässig bis zum Glasrand ausdehnt. Nach dem Abkühlen hat man eine Gelschicht von 1,5 mm Dicke und spiegelglatter Oberfläche.

b) *Die Elektrophorese in Agar-Gel.* Entsprechend der von uns ausgearbeiteten Technik[51] werden je ein Stücklein Whatman-Papier Nr. 17 (5 × 5 mm) in das aufzutrennende Serum und in eine Verdünnung desselben,

[44] M. MACHEBOEUF, J. DUBERT und P. REBEYROTTE, Bull. Soc. Chim. biol. *35*, 346 (1953).
[45] W. G. JONES und S. PEAT, J. chem. Soc. *1942*, 225.
[46] J. JONES und F. SMITH, Adv. Carbohyd. Chem. *4*, 243 (1949).
[47] H. NEUKOM, Mitt. Agrikult. Chem. Inst. ETH. Zürich, 1949.
[48] P. GRABAR, W. NOWINSKY und B. GENERAUX, Nature *178*, 430 (1956).
[49] J. SOLMS und H. DEUEL, Helv. chim. Acta *38*, 321 (1955).
[50] P. GRABAR, Proc. III. Int. Congr. Biochem. Brüssel *1955*, 37.
[51] CH. WUNDERLY und V. BUSTAMANTE, Klin. Wschr. *35*, 758 (1957).

1:6 (NaCl), getaucht. Die ausgiebig benetzten Papierchen werden auf die Mitte des Agar-Geles (quer zur Längsrichtung) so aufgesetzt, dass zwischen ihnen ein Abstand von 10 mm verbleibt. Ohne dass die Papierchen angedrückt werden, diffundiert das Serum rasch in das Agar-Gel. In die Mitte zwischen die beiden Papierchen und längs zum Agar-Plättchen wird mit doppelt gebogenem Blech eine kleine Rinne von 1 mm Weite gestanzt. Nach 30 min werden die Papierchen entfernt und über die Stelle ihrer Auflage 10 ml 0,86% NaCl fliessen gelassen. Die Oberfläche des Gels muss alsbald völlig gleichmässig erscheinen. Dadurch besteht die Gewähr, dass bei der nachfolgenden Auswertung keine zurückhängenden Proteine an der Auftragstelle einen Gradienten vortäuschen. Zwischen den Papierenden (siehe Abb. 1*a*), welche den Strom zuführen (und möglichst kurz zu halten sind), wird eine Stromdichte von 4,9 mA/cm (Breite: 4 cm) und eine Feldstärke von 3,5 V/cm (Distanz der Papierenden: 14 cm) angelegt.

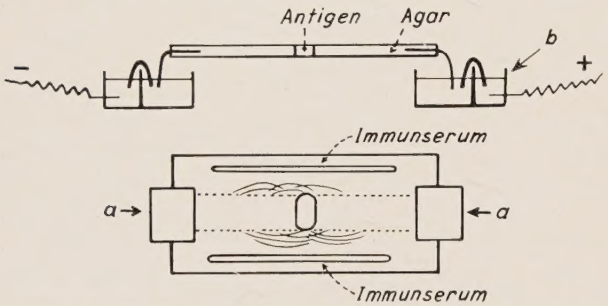


Abb. 1. Schema der Anordnung zur Immunoelektrophorese. *a* = Papiere zur Stromzuführung, *b* = Wannen mit Pufferlösung.

Als Elektroden dient Platindraht von der Länge der Elektrodengefässe; um pH-Änderungen zu vermeiden, strömt während der Elektrophoresedauer Pufferlösung langsam durch die Gefässe (siehe Abb. 1*b*). Um eine einwandfreie Trennung von Albumin und α_1-Globulin zu erreichen (Abb. 2), ist es notwendig, die Stromverhältnisse möglichst genau einzuhalten. Wie neuerdings WIEME[52] feststellte, war mit der bisherigen Technik die erwähnte Trennung nur unbefriedigend zu verwirklichen. Jedoch zeigen neuerdings die Ergebnisse von CLEVE und HARTMANN[53] an 8 Rheumatikerseren mit Immunoelektrophorese in Agar-Gel die Wichtigkeit der 4 Präzipitatlinien im α_1-Globulinbereich für die klinische Aussage.

Wie aus Abbildung 2 hervorgeht, ist die Auftragsstelle nicht mehr sichtbar und es fehlt auch jedes Depot hitzedenaturierter Proteine. Die erreichte Auftrennung ist jener in Papier recht ähnlich und bildet eine gute Ausgangslage für die anschliessende Reaktion mit dem Antiserum. *Nur wenn diese Voraussetzung erfüllt ist, kann eine sichere Lokalisation der Präzipitatlinien gewährleistet werden.* Wünscht man eine Kontrolle des Fortganges der Agar-Elektrophorese, so unterbricht man nach 4–5 h den Strom und legt die Agar-Plättchen in eine 2prozentige Lösung von Essigsäure. Nach einer Stunde sind die denaturierten Proteinfraktionen gut zu erkennen. Für Weiterbehandlung siehe Abschnitt 4: Die Färbung. Über Zonenelektrophorese im Agar-Gel haben BOCKEMÜLLER und OERTER[54] berichtet.

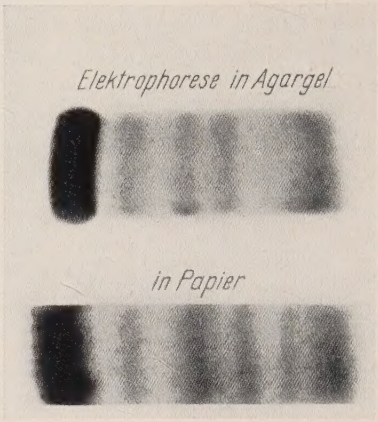


Abb. 2. (Aus CH. WUNDERLY und V. BUSTAMANTE, 1957)

c) *Die Diffusion des Antiserums.* Nach Stromunterbruch wird auf den Agar-Plättchen am oberen und unteren Ende ein kleines Stück vom Agar-Gel abgehoben und auf das Glas Leukoplaststreifen aufgeklebt. Auf ihnen vermerkt man Serum und Antiserum. Nun wird aus der bereits vorgestanzten Mittelrille das Agar-Gel herausgehoben und an dessen Stelle 0,10 bis 0,15 ml des Antiserums bzw. der Antiserumverdünnung gleichmässig aus einer Mikropipette verteilt. Kaninchen-Antisera werden unverdünnt verwendet, während man Pferde-Antiserum[55] von hohem Titer 1:1 mit physiologischem NaCl verdünnen kann. Um der Diffusion Zeit zu lassen, werden die Agar-Plättchen für 2–3 Tage in eine feuchte Kammer mit konstanter Temperatur (18° sind optimal) gestellt. Anschliessend gelangen sie für 2 Tage in ein Bad von physiologischem NaCl, das man pro Tag zweimal wechselt. Man erreicht damit, dass die an der serologischen Reaktion nicht beteiligten Proteine eluiert werden und die Färbung der Präzipitatlinien nicht stören.

d) *Die Färbung.* Nach vollendeter Elution wird die Agar-Schicht mit einem Streifen von leichtbefeuchtetem Filterpapier bedeckt. Dasselbe muss gleichmässig aufliegen. Etwa 20 cm über den bedeckten Plättchen dreht man eine Infrarotlampe an. Ein starker Luftstrom sorgt für rasche Evaporation und verhindert ein Ansteigen der Temperatur (höchstens handwarm).

[52] R. J. WIEME, Rev. belge Path. *25*, 62 (1957).
[53] H. CLEVE und F. HARTMANN, Klin. Wschr. *35*, 334 (1957).
[54] W. BOCKEMÜLLER und A. OERTER, Naturwiss. *43*, 398 (1956); Z. anal. Chem. *156*, 120 (1957).
[55] Pferde-Antiserum gegen Humanserum, normal, kann vom kommerziellen Dienst des Pasteur-Institutes in Paris bezogen werden. Das standardisierte Ergebnis mit Humanserum, normal, in der Immunoelektrophorese ist mitgegeben.

Tabelle I

Technik	Serummenge ml	Immunserum (Pferd) ml	Versuchsdauer	
			Elektrophorese	Diffusion
Makromethode	0,05–0,20	0,05–0,07	4–5 h mit 3,5 V/cm	2–3 Tage
Mikromethode[59]	0,001	0,005	45 min mit 6 V/cm	½–24 h

Zugleich mit dem Wasser des Gels wandern auch die Salze der Puffersubstanzen in das Papier. Dies ist die Vorbedingung für einen glasklaren Agar-Film. Nach etwa 30 min rollen sich die Papierstreifen auf und lassen damit erkennen, dass die Evaporation beendet ist. Das getrocknete Agar-Gel wird unter dem Wasserstrahl von anhaftenden Papierteilchen befreit und gelangt in das Farbbad.

Für die Färbung mit *Amidoschwarz* löst man in 900 ml Azetat-Puffer (60 g Eisessig + 13,6 g Na-Azetat · 3 H_2O im l) 1 g Amidoschwarz. Nach 60 min wäscht man den überschüssigen Farbstoff aus, indem man je 30 min in einem Bad von essigsaurem Methanol belässt (450 ml Methanol, 450 ml H_2O, 100 ml Eisessig).

Für die Färbung mit *Azokarmin*[56] löst man 0,5 g Azokarmin in 1 l Azetat-Puffer (830 ml H_2O, 20 ml Eisessig, 150 ml Glyzerin). Nach 5 h im Farbbad wird die überschüssige Farbe abgespült und für 2 h in Azetat-Puffer/Glyzerin gelegt (einmal erneuert). Nach dem Trocknen kann der Agar-Film vom Glas abgezogen und in dieser haltbaren Form aufbewahrt werden.

Nach der Elektrophorese in Agar-Gel können auch die *Lipoproteide*[57], *Glukoproteide*[58] und *Azetalphosphatide*[58] durch entsprechende Färbung sichtbar gemacht werden.

e) *Die Mikromethode.* Die Mikromethode zur Immunoelektrophorese, wie sie von SCHEIDEGGER[59] ausgearbeitet wurde, vereinigt als hauptsächliche Vorteile die auf 24 h abgekürzte Versuchsdauer und eine wesentlich kleinere Menge von benötigtem Immunserum. Wir entnehmen seiner Darstellung die obigen Vergleichszahlen[59] (s. Tabelle).

Das 2%-Agar-Gel enthält Veronal-Puffer vom pH 8,2 und von der Ionenstärke 0,1. Davon werden auf je 1 Objektträgerglas 2 ml erstarren gelassen; die Geldicke beträgt 1 mm. Bereits nach 30 min der Diffusion werden die ersten Präzipitatlinien sichtbar. Da hochwertige Antisera vom Pferd einen beträchtlichen Seltenheitswert besitzen, verdient die Mikromethode, insbesondere bei Serienuntersuchungen von klinischem Interesse, eine breitere Anwendung.

Neuerdings wurden auch Mikromethoden beschrieben von MONNIER und FISCHER[60] sowie von WIEME und RABAEY[61]. Um die Mukoproteine des Serums abzutrennen, führt GIRI[62] eine zweidimensionale Agar-Elektrophorese durch; in der einen Richtung benützt er Veronal/Azetatpuffer vom pH 8,6 und anschliessend rechtwinklig dazu einen Milchsäure/Azetatpuffer vom pH 4,5.

f) *Aufzeichnung der Resultate.* Für die *photographische Wiedergabe der nichtgefärbten Präzipitatlinien* im Agar-Gel hat sich folgende einfache Technik am besten bewährt. Man füllt eine Porzellanwanne halb mit physiologischem NaCl und legt in der Dunkelkammer ein steifes photographisches Papier mit der Schicht nach oben auf den Grund der Wanne. Nun wird die Glasplatte mit dem Agar-Gel so aufgelegt, dass keine Luftblasen zwischen ihr und dem Papier bestehen. Für die Kontrolle der kurzen Belichtungszeit dient ein Belichtungsregler mit Uhrwerk. Das belichtete Papier wird in den Entwickler gelegt und unter Rotlicht möglichst kontrastreich entwickelt, gewaschen und fixiert. *Gefärbte Agar-Filme* bildet man auf Kontrastfilm ab. Die Papierkopien ergeben schwarze Linien auf hellem Grund.

Deutung des Ergebnisses. Da die Untersuchung des normalen menschlichen Serums[63] schon oft vorgenommen wurde, haben die Resultate (Stärke und Umfang der Präzipitatlinien) in bezug auf das jeweils angewandte Immunserum eine gewisse Standardisierung erfahren. Wie die übrigen serologischen Methoden ist auch die Immunoelektrophorese mit der Unzulänglichkeit belastet, dass es unmöglich ist, Antisera herzustellen mit analoger Wirkungsbreite. Hier wird eine Grenze der biologischen Methoden sichtbar, wo die individuelle Spezifität des Tierorganismus die analytisch erreichbare Reproduzierbarkeit einengt. Daraus leitet sich ab, dass es ungleich wertvoller ist, von einem guten Immunserum eine grössere Menge zu besitzen, als von mehreren Antisera gesamthaft dasselbe Volumen. Schon diese quantitativen Überlegungen führen zu

[56] J. URIEL und P. GRABAR, Ann. Inst. Pasteur *90*, 427 (1956).

[57] J. URIEL und J. SCHEIDEGGER, Bull. Soc. Chim. biol. *37*, 165 (1955). – J. URIEL und P. GRABAR, Bull. Soc. Chim. biol. *38*, 1253 (1956).

[58] J. URIEL, P. GRABAR und CH. WUNDERLY, Clin. chim. Acta *2*, 35 (1957).

[59] J. SCHEIDEGGER, Int. Arch. Allergy *7*, 103 (1955); Übersicht von Ergebnissen: C. R. IV[e] Journées Biochimiques, Montpellier, Mai 1957.

[60] J. MONNIER und R. FISCHER, Bull. Soc. Chim. biol. *39*, 145 (1957).

[61] R. J. WIEME und M. RABAEY, Naturwissenschaften *44*, 112 (1957).

[62] K. V. GIRI, Nature *179*, 632 (1957); vgl. Naturwissenschaften *43*, 448 (1956).

[63] E. MARTIN, J. J. SCHEIDEGGER, P. GRABAR und C. A. WILLIAMS, Bull. Acad. suisse Sci. méd. *10*, 193 (1954). – C. WILLIAMS und P. GRABAR, J. Immunol. *74*, 158, 397, 404 (1955). – F. SCHEIFFAHRT, G. BERG und W. FRENGER, Klin. Wschr. *34*, 134 (1956).

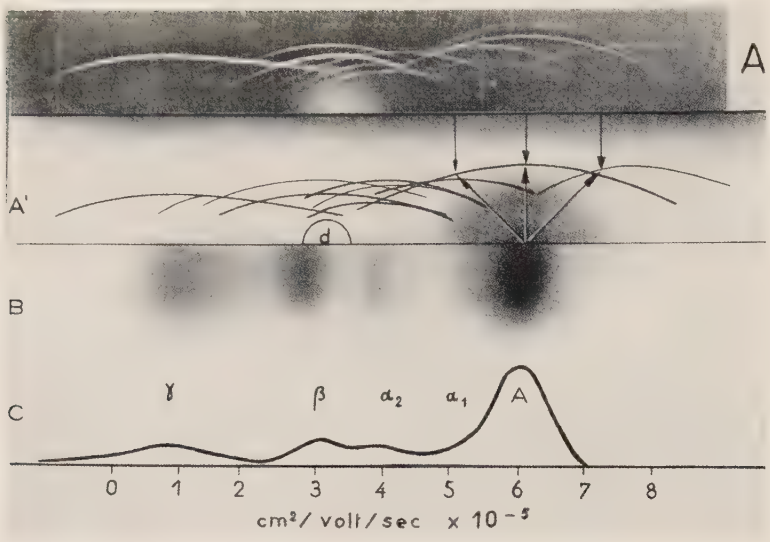


Abb. 3. Von oben nach unten: *A* Präzipitatlinien im Agar-Gel längs eines aufgetrennten Serums. *A'* Schema und Zuordnung der Linien. *B* Elektrophorese auf Papier. *C* Elektrophorese nach TISELIUS desselben Serums und in demselben Puffer. [Aus: P. GRABAR und C. A. WILLIAMS, Biochim. biophys. Acta *17*, 67 (1955).]

der Überlegenheit des Pferdes als Produzent von Antiserum gegenüber den kleinen Laboratoriumstieren.

Auf Abbildung 4 werden die Ergebnisse der Immunoelektrophorese (*A* und *A'*) gegenübergestellt jenen mit Papierelektrophorese (*B*) und freier Elektrophorese (*C*). Während in *B* und *C* eine Auftrennung in 5 Fraktionen stattfindet, gelingt es mit der Technik *A*, 16 bis 18 Komponenten sichtbar zu machen. Beginnt man deren Beschreibung nach Massgabe ihrer Wanderungsgeschwindigkeit, so stehen noch vor dem Serumalbumin ein oder zwei kleinere Komponenten, welche von GRABAR[50] mit ϱ bezeichnet werden. Offenbar ist ihr Gehalt so gering, dass sie mittels Papierelektrophorese im Serum zumeist nicht deutlich, dagegen im menschlichen Liquor cerebros. mehrfach beobachtet werden konnte (als einzelne Unterfraktion). Auf der Höhe des Serumalbumins erscheint eine Präzipitatlinie, welche recht verschieden deutlich ausfällt. Es ist dies eine Folge des hohen Albumingehaltes bzw. des Antigenüberschusses; die Präzipitatlinie kann sich verbreitern bis zur Verdoppelung oder zufolge von Auflösung völlig verschwinden. Unter der Albuminlinie befindet sich noch die kleinere Linie eines Proteins, das in der Fraktion V von COHN nicht enthalten ist; der Nachweis gelang auf Grund der Absorption des Immunserums mittels dieser Fraktion. Insofern die *Absorption des Immunserums* mit einem hinlänglich gereinigten Protein vorgenommen wird, gelingt auf diese Weise der *Identitätsnachweis* neben weiteren Proteinen. Darin kommt die Wichtigkeit von stetig verbesserten präparativen Methoden[64] zum Ausdruck. Umgekehrt erlaubt die Immunoelektrophorese eine besonders genaue *Prüfung auf Einheitlichkeit gefällter Fraktionen*[65]. Auf der Höhe des α_1-Globulins werden bei guter Auftrennung nicht weniger als 3 Präzipitatlinien sichtbar, im Gebiet des α_2-Globulins sogar bis deren 5. Davon bezeichnet die eine das Haptoglobulin[66], dessen Hämoglobinkomplex mit der Beweglichkeit von β-Globulin[67] wandert. Im Bereich des β-Globulins werden 3 Linien sichtbar, wovon 2 einander recht benachbart sind. Diejenige mit der langsameren Diffusion bezeichnet das Siderophilin; die grosse Feinheit der Linie lässt auf einen kleinen Gehalt schliessen; der färberische Nachweis gelingt nur nach entsprechender Anreicherung. Im normalen Serum findet sich stets die Linie des β_2A. Daneben befindet sich noch ein β_2M, das normalerweise nur in sehr kleiner Menge vorhanden ist, um in Fällen von Makroglobulinämie um so stärker hervorzutreten. Hier wird sichtbar, dass die Zuteilung von Präzipitatlinien zu elektrophoretisch getrennten Fraktionen nicht immer völlig eindeutig erfolgen kann, da damit noch Gehalte nachgewiesen werden, die zur Bildung einzelner Gradienten nicht ausreichen, sondern in anderen Fraktionen mitenthalten sind. So überschreitet auch die einzige Linie im γ-Globulingebiet den Bereich dieser Fraktion und reicht oft bis zu dem α_2-Globulin. Aus dem flachen, lang ausgedehnten Kurvenverlauf kann man schliessen, dass γ-Globulin eine ganze Anzahl von Proteinen umschliesst mit derselben Spezifität als Antigen; es sind somit in der β_1-Globulinzone und manchmal selbst in der α_1-Globulinzone Proteine vorhanden, deren immunologische Eigenschaften identisch sind mit γ-Globulin, welche jedoch in der Elektrophorese eine abweichende Beweglichkeit aufweisen. Aus dem Gesagten ergibt sich die bedeutende Verfeinerung der Auftrennung der Serumproteine mittels der Immunoelektrophorese. Gleichzeitig ist es ein Hinweis auf *die Heterogenität der mit einfacher Elektrophorese aufgetrennten Fraktionen*. Ein gültiger Beweis dafür wurde durch folgendes Experiment erbracht[68]. Ein Agar-Gel, in welchem in üblicher Weise ein normales menschliches Serum aufgetrennt worden war, wurde durch Querteilung in 50 gleich grosse Felder geteilt; die Agar-Stückchen eines jeden Feldes wurden erneut der Agar-Elektrophorese unterworfen und darauf mit einem Pferde-Immunserum ge-

[64] H. E. SCHULTZE, Z. Elektrochem. *60*, 262 (1956); II. Coll. Bruges *1954*, 83.

[65] C. A. WILLIAMS, II. Coll. Bruges *1954*, 57.

[66] P. BURTIN, P. GRABAR, G. BOUSSIER und M. F. JAYLE, Bull. Soc. biol. *36*, 1029 (1954).

[67] M. JAYLE, G. BOUSSIER und J. BADIN, C. R. II. Congr. Biochim. Paris *1952*, 183.

[68] P. GRABAR, [50]; C. WILLIAMS und P. GRABAR, [63].

Tabelle II

Aufnahme Abbildung 4	*a*	*b*	*c*	*d*	*e*	*f*	*g*	*h*	*i*
Vol. Antigene mm^3	1	1	1	1	1	$^1/_2$*	$^1/_4$*	$^1/_6$*	$^1/_6$*
Vol. Immunserum mm^3 . .	1	2	3	4	5	5	5	5	15
Verhältnis	$^1/_1$	$^1/_2$	$^1/_3$	$^1/_4$	$^1/_5$	$^1/_{10}$	$^1/_{20}$	$^1/_{30}$	$^1/_{90}$

* sind entsprechende Serumverdünnungen mit physiologischem NaCl.

prüft. Auch in dieser Grössenordnung gelangen einwandfreie Präzipitatlinien sowie der Nachweis der obenerwähnten Komponenten[69]; einzig das Albumin hatte sich auf Grund seiner rascheren freien Diffusion etwas gegen die langsamer wandernden Fraktionen verlagert.

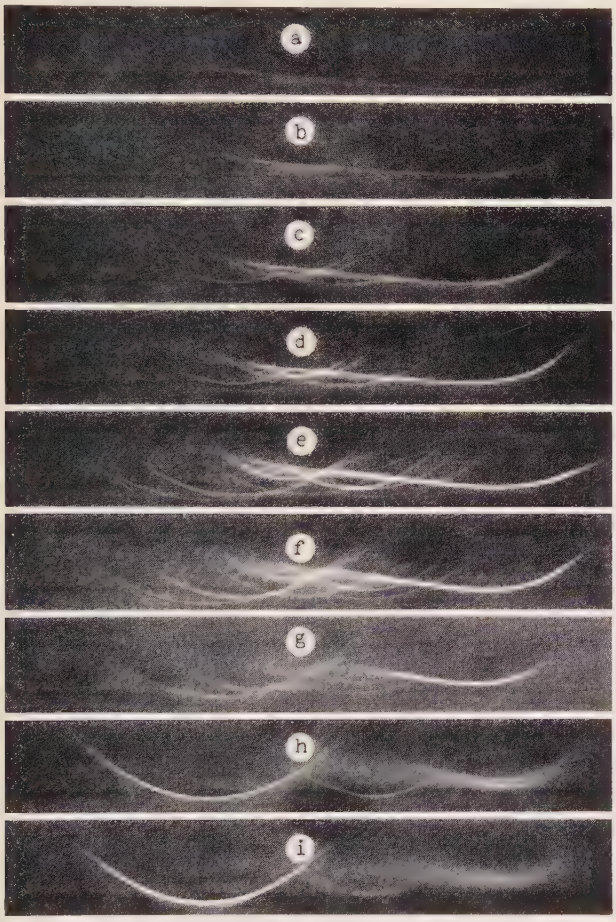


Abb. 4. Variation der relativen Gehalte der Komponenten. Von oben nach unten: Überschuss des Antigens, optimale Verhältnisse, Überschuss an Antiserum. [Aus: J. J. SCHEIDEGGER, Int. Arch. Allergy, N. Y. *7*, 103 (1955).]

Die Immunoelektrophorese ermöglicht es, auch *die Wanderungsgeschwindigkeit der verschiedenen Antikörper* zu bestimmen. Dafür wird erst das zu prüfende Immunserum aufgetrennt und die Reaktion im Agar mit entsprechenden Antigenen verfolgt. Auf diese Weise wurde der Nachweis erbracht[68], dass im Immunserum vom Pferd Antikörper mit unterschiedlicher elektrophoretischer Beweglichkeit vorhanden sind oder Antikörper von derselben Spezifität jedoch von abweichender Beweglichkeit.

II. *Ergebnisse mit Immunoelektrophorese.* An den Beginn dieses Abschnittes stellen wir eine Arbeit, in welcher der Einfluss einer systematischen Veränderung des Verhältnisses von Antigen/Antikörper zur Darstellung gelangt. SCHEIDEGGER[59] hat diese Gehalte in der obigen Tabelle zusammengestellt.

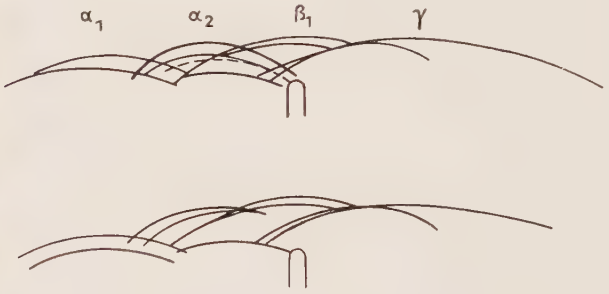


Abb. 5. Oben: Präzipitatlinien mit Antiserum, Mensch, normal. Unten: Linien mit demselben Serum, jedoch nach Absättigung mit Haptoglobin. Die Linie, welche verschwindet, ist oben gestrichelt. [Aus: P. BURTIN, P. GRABAR, Mlle G. BOUSSIER und M. F. JAYLE, Bull. Soc. Chim. biol. *36*, 1029 (1954).]

Neun Proben von normalem menschlichem Serum stehen in abgestuftem Verhältnis 9 Proben eines entsprechenden Pferde-Antiserums (Mensch) gegenüber. Es genügt somit eine Variation des Verhältnisses von $^1/_1$ bis $^1/_{90}$, um sehr erhebliche Veränderungen der Präzipitatlinien sichtbar werden zu lassen (Abb. 5).

Während auf *a* und *b*, also im Gebiet des Antigenüberschusses, als erste Linie diejenige des γ-Globulins in Erscheinung tritt, kommen in *c* und *d* weitere Linien von Globulinunterfraktionen hinzu. Das Zustandekommen dieser Präzipitatlinien ist wahrscheinlich auch von der Löslichkeit des Antigens abhängig; sie ist bei Albumin sehr viel grösser als bei γ-Globulin (WILLIAMS[70]). In *d* wird gut sichtbar, wie die γ-Globulinlinie weit in andere Bereiche hineingreift und eine ausgesprochen asymmetrische Form aufweist (GRABAR[71]).

[69] P. GRABAR, Arch. Sci. biol., Bologna *39*, 589 (1955); Thérapie *9*, 163 (1954).

[70] C. A. WILLIAMS, Bull. Soc. Chim. biol. *36*, 1407 (1954).

[71] P. GRABAR in: *Les γ-globulines et la médecine des enfants* (Paris 1955), S. 15.

Die Heterogenität der γ-Globuline, wie sie in dieser langausgedehnten Linie zum Ausdruck kommt, wurde auch bewiesen durch die Immunoelektrophorese eines Pferde-Antiserums (Mensch); dabei ergaben sich Antikörper mit verschiedener Wanderungsgeschwindigkeit, wenn erst das Antiserum elektrophoretisch aufgetrennt wurde und verschiedene hochgereinigte Proteine seitlich hinzudiffundierten. Mit dem Verhältnis von $^1/_5$, wie es in *e* verwirklicht ist, wird das Optimum erreicht, in welchem die grösste Anzahl von Linien sichtbar wird. Ein Zunehmen des Antiserum-Anteils (*f–i*) führt zu verwaschenen, ja teilweise wieder aufgelösten Linien der Globuline. Da im freien Antikörper die Löslichkeit bedingt wird durch die Attraktion von Wasserdipolen seiner polaren Gruppen, ist anzunehmen, dass eine Löslichkeitsverminderung eintritt, wenn diese Gruppen durch die Bindung mit Antigen abgesättigt werden[72]. Ist diese Absättigung zufolge von Antikörperüberschuss (Abb. 4 *h* und *i*) nur teilweise verwirklicht, so genügt der restliche Wassermantel, um das Präzipitat zu lösen. In *f* und *g* wird die Linie des ϱ sichtbar. Im Maximum des Antiserum-Überschusses bleibt als einzige Linie diejenige des Albumins, ebenfalls übergreifend in den Bereich des α-Globulins. Der Reihenversuch zeigt, dass der Tierorganismus nicht in einfacher Proportion Antikörper entstehen lässt nach Massgabe der Antigene im injizierten Serum. Die Methode zeichnet den Weg vor für die systematische Untersuchung der Variabilität der Antigene, der Spezies, der Individuen, sowie der Dosierung und Applikationsweise der Antigene und der Begleitfaktoren im physiologischen und pathologischen Stoffwechsel.

Ähnlich wie das γ-Globulin des menschlichen Serums Objekt einzelner immunochemischer Studien wurde, konnte auch das *β-Lipoprotein* im Blutplasma untersucht werden. Hierfür verwendeten Korngold und Lipari[73] die nach der Cohnmethode 10 gewonnenen Fraktionen I + II + III, IV + V, den NaCl-löslichen Anteil von III sowie Vollplasma, das durch Flotation in der Ultrazentrifuge bei der Dichte von 1,063 g/ml vom Lipoprotein getrennt wurde. In Ouchterlony-Gelplatten wurden in die zentral angeordneten Stanzlöcher der Agar-Schicht Immunsera vom Kaninchen gegen die Fraktion III (Cohn) gegeben. An den Diffusionsgrenzen bildeten sich Präzipitatlinien, von denen sich die lipoproteinhaltigen mit Sudanschwarz selektiv färben liessen. Die Plasmafraktionen II (IV + V), VI und der NaCl-lösliche Anteil von III erwiesen sich als lipoproteinfrei. Wiederum war die Reinheit der ausgefällten Fraktionen Voraussetzung, um die Beeinflussung der serologischen Reaktion durch Begleitprotein ausschliessen zu können. In der Immunoelektrophorese wird eine schwache Präzipitatlinie sichtbar, welche dem β_2-Globulin zugeschrieben wird. Jedoch ist es methodisch vorteilhaft, ein Antiserum zu verwenden, das erst mit γ-Globulin abgesättigt wurde[74]. Die Gruppe der β-Globuline bildet zumeist 4 Präzipitatlinien, von welchen 2 eine ähnlich rasche Diffusion zeigen und sich manchmal überdecken. Eine weitere Linie ist nur schwach sichtbar und fehlt oft auch ganz, da wenig Antikörper in dem von der Gruppe Grabar verwendeten Immunserum vom Pferd Nr. 31[74] vorhanden sind. Gleichwohl konnte dieses β-Globulin von Grabar[75] als *Siderophilin* identifiziert werden. Dieses metallbindende Globulin wurde von Koechlin[76] als Fraktion IV-7,2 mit einer Reinheit von 90–95% und einer Ausbeute von 0,42 g pro l Plasma durch Fällung mit Äthanol isoliert; sein Molekulargewicht beträgt 90000, und es werden 2 Atome Fe/Mol (= 0,13%) gebunden. Die Immunoelektrophorese gestattete die genaue Lokalisation des Siderophilins; 200 μg eines kristallisierten Präparates[77] wurden in 0,05 ml von normalem Serum gelöst und in üblicher Weise aufgetrennt[75]; für die spezifische Präzipitation diente 1 ml Pferde-Antiserum total (Mensch). Vorversuche hatten ergeben, dass diese Menge etwa 150 μg des Präparates[77] präzipitiert. In der Folge zeigte sich eine einzelne Linie im Bereich der β_1-Globuline; die Identität wurde nachgewiesen durch die Reaktion mit einem Immunserum, dessen homologe Antikörper abgesättigt waren. Die Darstellung des erforderlichen Kaninchen-Antiserums haben Grabar und Burtin[78] beschrieben.

Neuerdings wurde durch Uriel, Götz und Grabar[79] mittels Immunoelektrophorese auch das *Ceruloplasmin* lokalisiert und das Kupfer durch kolorimetrische Mikromethode (Alizarinblau) bestimmt. Die beiden Ceruloplasmin-Präparate waren aus normalem, menschlichem Serum isoliert worden. Ihre Wanderung führt sie in den Bereich des α_2-Globulins. Bei einem angenommenen Molekulargewicht von 155000 werden 6 Atome Kupfer pro Mol gebunden.

Auch Gell[80] hat mittels Immunoelektrophorese das Verhalten von γ-Globulin, Ceruplasmin und Siderophilin gegenüber Antisera geprüft. Seine Ergebnisse bestätigen die obenerwähnten Lokalisationen.

Für die Untersuchung des *Haptoglobins* stand ein Präparat[81] von hoher Reinheit zur Verfügung (Verunreinigung 1%); sein Molekulargewicht ist 85000 und der Hexosegehalt 11,3%, davon sind 5,7% Hexosamin. Seine Wanderungsgeschwindigkeit war mit Papierelektrophorese als analog wie α_2-Globulin gefunden worden[81], was die Immunoelektrophorese durch Burtin, Grabar, Boussier und Jayle[82] bestätigte. Die

[72] W. C. Boyd, J. exper. Med. *75*, 407 (1942).
[73] L. Korngold und R. Lipari, Science *121*, 107 (1955).
[74] P. Grabar und P. Burtin, Presse méd. *63*, 804 (1955).
[75] P. Grabar, Ann. Acad. Sci. fenn., II. Chemica *1955*, 401.
[76] B. A. Koechlin, J. chem. Soc. *74*, 2649 (1952).
[77] Behringwerke Marburg a. d. L. (Prof. H. Schultze).
[78] P. Grabar und P. Burtin, Bull. Soc. Chim. biol. *37*, 797 (1955).
[79] J. Uriel, H. Götz und P. Grabar, Schweiz. med. Wschr. *1957*, 431.
[80] P. G. Gell, J. clin. Path. *10*, 67 (1957).
[81] M. F. Jayle und G. Boussier, Bull. Soc. Chim. biol. *36*, 959 (1954).
[82] P. Burtin, P. Grabar, G. Boussier und M. F. Jayle, Bull. Soc. Chim. biol. *36*, 1029 (1954).

Haltbarkeit der Lösungen in den üblichen Puffersystemen ist beschränkt. Um ein absorbiertes Antiserum zu gewinnen, wurde 1 ml des Pferde-Antiserums total (Mensch) mit 400 μg des Haptoglobin-Präparates vermischt und das spezifische Präzipitat abzentrifugiert. Mit dem Antiserum-Rest fehlte eine Linie im α_2-Globulinbereich, welche sich durch eine mittlere Diffusionsgeschwindigkeit auszeichnet (Abb. 6).

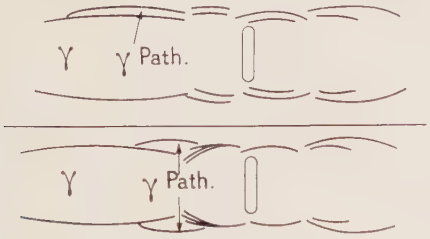


Abb. 6. Längs der Mittellinie diffundierte ein Antiserum, welches erst mit Bence-Jones-Uroprotein abgesättigt worden war. [Aus: P. Burtin, L. Hartmann, R. Fauvert und P. Grabar, Rev. franç. Et. clin. biol. *1*, 17, 175 (1956).]

Die Versuche ergeben, dass sowohl *Haptoglobin wie Siderophilin unabhängige Proteine im menschlichen Blutserum sind.* Auch solche Körperflüssigkeiten, die ausgesprochen proteinarm sind, wie Liquor cerebrospinalis und Synovialflüssigkeit, wurden von Gavrilesco, Courcon, Hillion, Uriel, Lewin und Grabar[83] im Agar-Gel aufgetrennt und anschliessend serologisch untersucht.

In umfassender Weise wurden die Proteine der menschlichen *Synovial-Flüssigkeit* (normal, rheumatische Arthritis, Neuroarthropathie, Trauma) von Schmid und Macnair[84] untersucht. Für die Immunoelektrophorese wurde ein Boratpuffer von 1T 0,07 Mol $Na_2B_4O_7$ und 2T 0,07 Mol H_3BO_3 verwendet; er besitzt ein pH von 8,6 und $\tau/2 = 0{,}07$. In 2%-Agar-Gel betrug die Trenndauer 17 h bei 180 V und 40 mA. In der Folge ergaben sich analoge Präzipitatlinien wie bei Serumprotein; die Identität wurde bei Albumin und γ-Globulin erbracht. Das *Linsenprotein des Menschen* wurde von Wieme und Rabaey[85] sowie Wieme und Kaminski[86] im Agar-Gel untersucht und dabei in mehrere Proteinfraktionen aufgetrennt.

Ebenso gelang es Grabar und Burtin[87] sowie Burtin, Hartmann, Fauvert und Grabar[88], im Blutserum von Patienten mit ausgedehnter Dysproteinämie (Myelom, sekundäres Knochenkarzinom, Lipoidnephrose) mit Immunoelektrophorese wesentliche Abweichungen zu finden vom gewohnten Bild normaler Sera. Während bei weiteren Hyperglobulinämien die Linie der γ-Globuline gesamthaft verstärkt erscheint, ist sie es bei Myelom nur abschnittsweise. In einigen der mit Immunoelektrophorese untersuchten 30 Fälle wurden auch abnorme Linien im Gebiete der γ-Globuline sichtbar (Abb. 6).

In einem Falle (Abb. 6 oberes Serum längs Mittellinie) konnte die pathologische Linie des γ-Globulins zum Verschwinden gebracht werden, wenn ein Immunserum hineindiffundierte, das vorgängig mit Bence-Jones-Uroprotein abgesättigt worden war. Eine weitere Anomalie zeigt sich im β_2-Globulin-Sektor, wo die Linie bald ganz ausfällt, bald aussergewöhnlich scharf und krummlinig erscheint. Die Endgruppenanalyse von Myelomprotein durch Putnam[89] weist auf eine Uneinheitlichkeit des chemischen Aufbaues hin. Ähnlich wie die neuen Studien über Myelomproteine mit Agar-Diffusionstest[73] und Ultrazentrifuge[90] erweisen auch die besprochenen Untersuchungen in qualitativer Weise das *Vorliegen anomaler Proteine.* Es wurde dies neuerdings bestätigt durch die Arbeit von Martin und Scheidegger[91]. Somit wurde ein Fortschritt erzielt gegenüber den Ergebnissen mit Papier-Elektrophorese, wo zumeist nur extreme Gehaltserhöhungen einzelner Globulinfraktionen beobachtet werden. Bei der Untersuchung von Sera von Patienten mit *Lipoid-Nephrose*[87] war erwartungsgemäss die Hauptlinie der Lipoproteide verstärkt, dagegen wurden *keine neuen Proteinlinien* beobachtet. Aus der Klinik kennt man öfters die völlige Normalisierung einer Nephrose, dagegen nicht diejenige eines Myeloms oder einer Makroglobulinämie. Es scheint daraus hervorzugehen, dass der Organismus ausserstande ist, eine gestörte Proteingenese wieder rückgängig zu machen.

Seitdem Waldenström 1948 erstmals die *Makroglobulinämie* beschrieben hat, sind die Arbeiten über diese Paraproteinämie nicht abgebrochen. Ultrazentrifugale Studien ergaben, dass im Kreislauf der Patienten im Mittel bis zu 28% des Plasmaproteins ein Teilchengewicht von 20 bis 30 Svedberg-Einheiten (S) aufweisen. Physiologischerweise enthält Serumprotein nur 2–4% mit dem Teilchengewicht von 20 S. Regniers, Wieme, Wunderly und Burtin[92] untersuchten sodann einen Fall von Makroglobulinämie mit Immunoelektrophorese und dem Agar-Plattentest. 66% des Serumproteins besass über 15 S, davon 14% 23–32 S. Die Immunoelektrophorese ergab immunchemische Anomalien im Bereiche der γ-Globuline. Neuerdings ermöglichte eine Zusammenarbeit von Burtin, Hartmann, Heremans, Scheidegger, Westendorp-Boerma, Wieme, Wunderly und Grabar[93] die Unter-

[83] K. Gavrilesco, J. Courcon, P. Hillion, J. Uriel, J. Lewin und P. Grabar, Bull. Soc. Chim. biol. *37*, 803 (1955).

[84] K. Schmid und M. Macnair, J. clin. Invest. *33*, 319 (1954).

[85] R. J. Wieme und H. Rabaey, III. Coll. Bruges *1955*, 157.

[86] R. J. Wieme und M. Kaminski, Bull. Soc. Chim. biol. *37*, 247 (1955).

[87] P. Grabar und P. Burtin, Presse méd. *63*, 804 (1955).

[88] P. Burtin, L. Hartmann, R. Fauvert und P. Grabar, Rev. franç. Et. clin. biol. *1*, 17, 175 (1956).

[89] F. W. Putnam, J. cell. comp. Physiol. *47*, 17 (1956).

[90] M. Petermann und M. Hamilton, Cancer *9*, 193 (1956).

[91] E. Martin und J. J. Scheidegger, Schweiz. med. Wschr. *1957*, 439.

[92] P. Regniers, R. Wieme, Ch. Wunderly und P. Burtin, Schweiz. med. Wschr. *86*, 1140 (1956).

[93] P. Burtin, L. Hartmann, J. Heremans, J. Scheidegger, F. Westendorp-Boerma, R. Wieme, Ch. Wunderly und P. Grabar, Rev. franç. Et. clin. biol. *2*, 161 (1957).

suchung von 26 Makroglobulinsera und 7 isolierten Makroglobulinen mit Immunoelektrophorese. Bei manchen Sera wurden im γ-Globulinbereich Anomalien beobachtet. Hierzu ist zu bemerken, dass die Immunoelektrophorese die einzige Methode darstellt, welche den *Beweis* erlaubt, *dass die atypischen Globuline bereits im nativen Zustande vorhanden sind.* Neuerdings wurde auch die Möglichkeit erörtert[94], ob das Agar-Gel-Netz die Teilchen von Makroglobulin stärker in ihrer Bewegung hemmt als Fibrinogen und noch ausgesprochener als Albumin. Eine interessante Anwendung der von SCHEIDEGGER entwickelten *Mikromethode*[59] hat der Genannte gemeinsam mit MARTIN und RIOTTON[95] gemacht; es wurde das Protein von *menschlichem Fötalblut* untersucht in der Altersstufe von 8 bis 40 Wochen. Bis zur 12. Woche ergeben sich nur 5 Präzipitatlinien an Stelle von 18 beim Serumprotein des Erwachsenen; es sind dies die Vorfraktion ϱ, Albumin, je ein α_1-, α_2- und ein β-Globulin. Im anschliessenden Zeitabschnitt erscheinen eine zweite Linie im Bereich der α_2-Globuline, ebenso im α_1- und β-Bereich; später eine dritte und vierte α_2-Linie, eine dritte β-Linie und verspätet erst die γ-Globulinlinie. Bei der Geburt fehlen noch die Linien von Fraktion β_2 sowie eine weitere im α_2-Bereich. Somit ist auch *Nabelschnurblut* noch inkomplett in qualitativer Hinsicht, was mit Papierelektrophorese nicht nachweisbar ist[96]. Ebenfalls mitder Mikromethode haben CLEVE und HARTMANN[53] 8 Rheumatikerseren untersucht. Von den 4 Präzipitatlinien des α_1-Globulins war diejenige des niedermolekularen, kohlenhydratreichen Säureproteides besonders deutlich. Dagegen konnte das C-reaktive-Protein (CRP) mit einem CRP-Antiserum nicht lokalisiert werden. Dasselbe gelang BUSTAMANTE, ARINO und MANUEL Y PINIÈS[97] und wurde von ihnen als im Bereich der γ-Globuline wandernd gefunden.

LAPRESLE[98] untersuchte das immunchemische Verhalten von *Abbauprodukten des menschlichen Albumins* mit Immunoelektrophorese und Agar-Plattentest (OUCHTERLONY). Dazu wurde Serumalbumin mit Milzextrakt (Kaninchen) enzymatisch abgebaut. Die Immunoelektrophorese ergab, dass die Antigenstruktur des menschlichen Albumins aus 3 spezifisch verschiedenen Anteilen besteht. MARIE KAMINSKY[99] untersuchte die Antigenstruktur von *Eiereiweiss, Ovalbumin, Conalbumin, Ovomucid* und *Lysozym* mittels Immunoelektrophorese und dem Agar-Plattentest (OUCHTERLONY). In der Folge erwies sich Ovomucid, mit Äthanol gefällt[100], als elektrophoretisch homogen, zeigte jedoch im Plattentest zwei Komponenten. Eiereiweiss enthält drei Fraktionen von Ovoglobulinen, welche, nach Massgabe ihrer Wanderungsgeschwindigkeit, wiederum je 2–3 Linien entstehen lassen.

Untersuchungen mittels Papierelektrophorese[101] hatten ergeben, dass die *Agglutinine des menschlichen Blutserums* in der Fraktion der γ-Globuline, insbesondere der γ_1-Globuline, lokalisiert sind. Die Anti-Rh-Antikörper wurden, in früheren Arbeiten mit Konvektions-Elektrophorese, auch unter den α- und β-Globulinen gefunden[102]. Daraufhin unternahmen FAURE, FINE, SAINT-PAUL, EYQUEM und GRABAR[103] eine entsprechende Studie mit Immunoelektrophorese. Dazu wurden die zu prüfenden Sera in einfacher Agar-Elektrophorese über 12 cm Länge aufgetrennt; dieser Bereich des Agar-Gels wird in 12 Abschnitte von je 1 cm Breite aufgeschnitten. Aus den 12 Agar-Segmenten wird das Protein mit physiologischem NaCl eluiert und in der Zentrifuge von Agar-Resten abgetrennt. Mit der überstehenden Flüssigkeit werden Erythrozyten-Suspensionen reagieren gelassen, welche das Antigen enthielten, dessen Antikörper gesucht ist. Die aufgetrennten Sera enthielten: Isoagglutinine anti-A, Iso-Immunagglutinine anti-A und anti-B, Iso-Immunagglutinine anti-Rh (C + D), sowie Cryoagglutinine in einem Fall von hämolytischer Anämie und zwei Fällen von infektiöser Mononukleose. Als Resultat könnten die Isoagglutinine anti-A und anti-B in den rasch wandernden Anteilen der γ-Globuline sowie in den β_1- und β_2-Globulinzonen lokalisiert werden; dabei verhalten sich die natürlichen und die Immun-Antikörper nicht verschieden. Auch die indirekte Reaktion von COOMBS erfährt durch die Immunoelektrophorese eine wertvolle Präzisierung[103].

Die antigene Wirkung synthetischer Polypeptide wurde von STAHMANN, TSUYUKI, WINKE, LAPRESLE und GRABAR[104] mittels Immunoelektrophorese und dem Ouchterlony-Test untersucht. Die Polypeptide wurden synthetisiert[105] aus *Leucin, Phenylalanin, Glutaminsäure* und *Lysin*; darauf wurden sie an ein homologes Protein gekuppelt, das Serumalbumin vom Kaninchen, und ebenso an ein heterologes Protein, das Serumalbumin vom Rind. Durch entsprechende Injektionsfolgen mit je 4 Kaninchen wurden Immunsera ge-

[94] R. WIEME, Rev. belge Path. *25*, 62 (1957).

[95] J. SCHEIDEGGER, E. MARTIN und G. RIOTTON, Schweiz. med. Wschr. *86*, 224 (1956).

[96] R. CASPANI, M. NEGRI und C. STICCA, Minerva paediatr. *5*, 67 (1953).

[97] V. BUSTAMANTE, J. ARINO und L. MANUEL Y PINIÈS, Presse méd. *65*, 313 (1957).

[98] C. LAPRESLE, Ann. Inst. Pasteur *89*, 654 (1955).

[99] M. KAMINSKY, J. Immunol. *75*, 367 (1955); Bull. Soc. Chim. biol. *36*, 79, 279, 291 (1954); II. Coll. Bruges *1954*, 69. – M. KAMINSKY und J. DURIEUX, Bull. Soc. Chim. biol. *36*, 1037 (1954).

[100] E. FREDERICQ und H. DEUTSCH, J. biol. Chem. *181*, 499 (1949).

[101] B. JANKOVIC und H. KRIJNER, Nature *171*, 982 (1953). – R. PAYNE und Q. DEMING, J. Immunol. *73*, 81 (1954).

[102] J. HILL, S. HABERMAN und R. GUY, Amer. J. clin. Path. *19*, 134 (1949). – J. CANN, R. BROWN, J. KIRKWOOD, P. STURGEON und D. CLARKE, J. Immunol. *68*, 243 (1952).

[103] R. FAURE, J. FINE, M. SAINT-PAUL, A. EYQUEM und P. GRABAR, Bull. Soc. Chim. biol. *37*, 783 (1955).

[104] M. STAHMANN, H. TSUYUKI, K. WEINKE, C. LAPRESLE und P. GRABAR, C. R. Acad. Sci. *241*, 1528 (1955).

[105] M. GREEN und M. STAHMANN, Proc. Soc. exper. Biol. Med. N. Y. *83*, 852 (1953). – R. RICE, M. STAHMANN und A. ALBERTY, J. biol. Chem. *209*, 105 (1954).

wonnen. Die mit den letzteren durchgeführte Immunoelektrophorese ergab einzelne Präzipitatlinien, als Beweis der Homogenität der Antigene. Auf Grund spezifischer Absorption konnten drei Antikörper im Antiserum (Serumalbumin, Rind/Polypeptide) nachgewiesen werden; die eine Linie entspricht dem heterologen Albumin, eine weitere dem entsprechenden

analyse[107] durch Immunoelektrophorese zeigte im Restplasma unverändert das Voralbumin ϱ, Albumin, eine α_1-, zwei α_2-Fraktionen, die als Siderophilin identifizierte β_1-Komponente sowie γ-Globulin. Cinader und Pearce[108] trennten in Agar-Gel Ribonuklease in die Komponenten *A* und *B* auf; anschliessend erfolgte die Diffusion von Ribonukleaseantiserum.

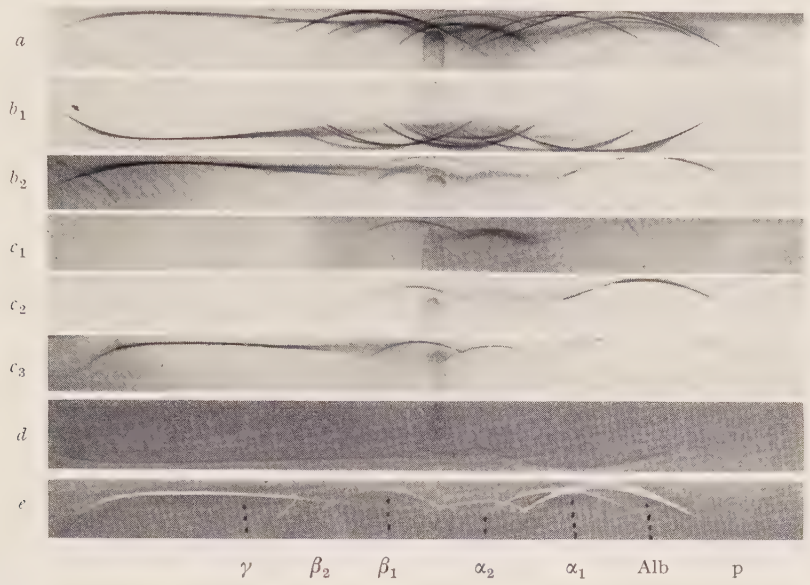


Abb. 7. Präzipitatlinien von Antisera *a* (Maulesel 282), b_1 (Pferd 31), b_2 (Pferd 1299), c_1 (Kaninchen 805), c_2 (Kaninchen 812), c_3 (Kaninchen 810), *d* (Huhn 2) und *e* (Ente 4) gegen normales Serum, human. Als Antigen jeweils in Agarelektrophorese aufgetrenntes normales Serum, human.

Polypeptid und eine dritte Linie der Kombination von beiden. Die obengenannten Immunsera präzipitierten nicht mit den freien synthetischen Polypeptiden, dagegen mit dem entsprechend gekuppelten Rinder-Albumin; sie gaben ferner Kreuzreaktionen mit Serumalbumin (Mensch, Pferd, Rind), Ovalbumin und γ-Globulin (Mensch, Rind). Aus Dichte und Lage der Linien im Agar-Gel wurde die *antigene Wirksamkeit* in folgender Reihe *abnehmend* gefunden: Leucin > Phenylalanin > Glutaminsäure > Lysin. Die spezifische Präzipitation konnte weder durch die synthetischen Polypeptide noch durch die freien Aminosäuren gehemmt werden.

Um eine Plasmaproteinlösung zu erhalten, bei deren Transfusion die Übertragung von Hepatitis-Virus mit grosser Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden kann, haben Nitschmann, Kistler, Renfer, Hässig und Joss[106] einen neuen Weg beschritten. Durch die Totalentsalzung des Blutplasmas an einem Gemisch von Kationen- und Anionenaustauschharzen (I.R. 120, IRA 410 Rohm und Haas Co., Philadelphia, USA.) lassen sich das Fibrinogen und die thermolabilen Globuline abtrennen, der Rest an Plasmaprotein kann bei 60°C während 10 h pasteurisiert werden. Die Antigen-

III. *Über die Grenzen der Methode.* Die vorgenannten Beispiele von Anwendungen zeigen, was für ausgedehnte Messmöglichkeiten mit der Immunoelektrophorese neu erschlossen werden. So möchte man glauben und wünschen, die Methode würde von einer grösseren Zahl von Forschungsstätten aufgenommen. Wenn bisher die einschlägigen Arbeiten überwiegend Grabar und seinem Mitarbeiterkreis zu verdanken sind, dann muss die beschränkte Anwendung ihren Grund haben. So mag es in vielen Fällen nicht leicht sein, Antisera in der notwendigen Menge und von entsprechend hohem Titer zu beschaffen; die Gewinnung der Immunseren aus Grosstieren (Pferd, Rind) ist an einen langwierigen, kostspieligen Immunisierungsprozess gebunden. Entsprechend dem langsamern Globulinstoffwechsel dieser Tiere ist mit einer hohen Misserfolgsrate zu rechnen. Besonders erwähnenswert aber ist eine Schwierigkeit, welche allen immunchemischen Methoden anhaftet und deren breite Anwendung in vielen Fällen verunmöglichte. Es ist die von Tier zu Tier abweichende Bildung von Antikörper, welche die mit verschiedenen Immunsera erzielten Ergebnisse so schwer vergleichbar macht.

[106] H. Nitschmann, P. Kistler, H. R. Renfer, A. Hässig und A. Joss, Vox sanguinis *1* [3] 183 (1956).

[107] Ausgeführt von J. J. Scheidegger.

[108] B. Cinader und J. H. Pearce, Brit. J. exper. Path. *37*, 541 (1956).

Als Beispiel mögen die Befunde von Munoz[109] dienen. Er immunisierte 18 Kaninchen in üblicher Weise mit kristallisiertem Serum-Albumin (Rind). Die Prüfung der Antisera gegen das zur Injektion verwendete Albuminpräparat ergab nach der Technik von Oudin im Agar-Gel: 1 Tier ohne Präzipitatlinie, 12 Tiere mit 1 Linie, 2 Tiere mit 2 Linien und schliesslich 3 Tiere mit 3 Linien. Solche wesentlichen Unterschiede können mit Immunoelektrophorese gut sichtbar gemacht werden[110]. Auf Abbildung 7 finden sich Präzipitatlinien, wo als Antigen jeweils normales Serum, human, im Agar-Gel aufgetrennt war mit Antisera, die in Maulesel (*a*), Pferd (b_1, b_2), Kaninchen (c_1, c_2, c_3), Huhn (*d*) und Ente (*e*) gegen Serum human gebildet waren, reagierten.

Der Vergleich von b_1 mit b_2 oder von c_1, c_2 mit c_3 zeigt eindrücklich die von Tier zu Tier abweichende Linienbildung. Es mag damit zusammenhängen, dass in solchen Fällen im Tierorganismus nicht nur Antikörper gegen ein einzelnes heterologes Protein gebildet werden soll, sondern gleich gegen ein ganzes Spektrum der verschiedensten Fraktionen und Unterfraktionen. Dadurch werden offenbar an den Stellen der Proteingenese Verdrängungen und Überschneidungen unvermeidlich. Es ist ebensowohl möglich, dass der Tierorganismus gegen die eine Proteinkomponente nur ungenügend Antikörper bildet wie eine extra starke Bildung begünstigt. In beiden Fällen kann man nur über passend gewählte Konzentration bzw. Verdünnung des Antiserums zu jener Gleichgewichtskonzentration gelangen, welche eine analytisch optimale serologische Reaktion gewährleistet. Auf diese Weise muss in jedem Falle ein neues Immunserum gewissenhaft ausgetestet werden. Eine gewisse Standardisierung der Resultate könnte erreicht werden, wenn die Testantigene als Bezugssubstanzen ausgetauscht würden. Diese Unsicherheit durch den «Tierfaktor» hat zur Folge, dass *Bestrebungen zur quantitativen Auswertung der Reaktion zurücktreten vor der Sicherstellung ihrer qualitativen Aussage.*

Nachdem die Immunoelektrophorese als Methode nur wenige Jahre besteht, darf erwartet werden, dass ihre Technik im Sinne einer Vereinfachung noch verbessert wird. Dessenungeachtet ist sie schon in ihren heutigen Ausführungsformen eine ausserordentlich wertvolle Methode zur serologischen Charakterisierung der verschiedensten Proteine und Proteide.

Summary

An account is given of Immuno-electrophoresis, as it originated from a combination of electrophoresis in agar-jelly and the various experiences with antigen/antibody reactions in gels. The theoretical background is detailed as well as different techniques. The increased sensitivity has gained us new insight into the composition of body fluids. Finally the limitations are discussed as they are proper to all reactions which have an immuno-chemical basis.

[109] J. Munoz aus: *Serolog. Appr. to studies of protein structure and metab.* (Rutgers Univ. Press 1954), S. 55.

[110] P. Grabar, technische Mithilfe von Mlle J. Courcon (unveröffentlichte Ergebnisse).

Brèves communications - Kurze Mitteilungen
Brevi comunicazioni - Brief Reports

Les auteurs sont seuls responsables des opinions exprimées dans ces communications. – Für die kurzen Mitteilungen ist ausschliesslich der Autor verantwortlich. – Per le brevi comunicazioni è responsabile solo l'autore. – The editors do not hold themselves responsible for the opinions expressed by their correspondents.

Antibiotics X-948 and X-1008

Two recent publications on Echinomycin[1] prompt us to publish the results of our investigation of two related antibiotics, X-948 and X-1008, of which the former is probably identical with Echinomycin. It yields the same degradation products (ammonia, quinoxaline-2-carboxylic acid, N-methyl-L-valine, L-alanine and D-serine) and resembles Echinomycin also in its physical properties[2].

Antibiotic X-948 was isolated from broth filtrates and cells of an apparently new Streptomyces species, our number X-948. This culture is possibly the same as *Streptomyces echinatus*[1], but there are at least two differences in the bacteriological characterization: *S. echinatus* does not grow on sodium citrate or liquefy gelatin, whereas *Streptomyces sp.* X-948 does both.

Antibiotic X-948 was also isolated from broths of *Streptomyces n. sp.* X-537 which produces a second crystalline antibiotic, designated as X-537A and described in 1951[3]. This streptomycete clearly differs from the

[1] R. Corbaz, L. Ettlinger, E. Gäumann, W. Keller-Schierlein, F. Kradolfer, L. Neipp, V. Prelog, P. Reusser, and H. Zahner, Helv. chim. Acta *40*, 199 (1957). – W. Keller-Schierlein and V. Prelog, Helv. chim. Acta *40*, 205 (1957).

[2] Prof. V. Prelog, to whom a sample of X-948 was sent, kindly compared the two antibiotics. He reported (personal communication) that they are very probably identical. He found that Echinomycin melted 8° lower than X-948, but that the mixed melting point showed no depression. The infrared absorption spectre were practically identical, with very small differences in the height of 3 weaker bands in the 8–8·5 μ region. Paper chromatography using the Bush C-system showed no differences.

[3] J. Berger, A. I. Rachlin, W. E. Scott, L. H. Sternbach, and M. W. Goldberg, J. Amer. chem. Soc. *73*, 5295 (1951).

two previous organisms in its lack of dark pigment production on many media, and its fermentation reactions towards such substrates as ribose, sucrose, raffinose and sodium nitrite.

A third *Streptomyces n. sp.* X-1008, isolated in our laboratories, produces a crystalline antibiotic X-1008 that appears to be closely related to, but is definitely different from antibiotic X-948 or Echinomycin. This streptomycete differs from *Streptomyces sp.* X-948 in its growth reactions toward arabinose, xylose, cellobiose, lactose, malate and tryptophane, but its pigment production is generally parallel on media where both of the cultures grow. Qualitatively, antibiotics X-948 and X-1008 have similar antibacterial spectra; there are, however, some quantitative differences, as well as only partial crossover with bacteria made resistant to each of the two substances.

Three additional unidentified streptomycetes (X-3565, X-3593 and X-3600) have been found to produce substances with antibacterial spectra very similar to that of antibiotic X-948[4]. From one of these (culture X-3565) an antibiotic was isolated, which was crystallized from the same solvent mixture as used for antibiotic X-948. The crystals gave no melting point depression with antibiotic X-948, and had the same antibacterial activity.

On a medium containing 2% soybean flour, 2% brown sugar, 0·5% cornsteep liquor concentrate and 0·1% K_2HPO_4, broth potencies with *Streptomyces sp.* X-948 in aerated 200 gallon tank fermentations have attained values equivalent to 1 g of antibiotic/l; yields of isolated crystalline antibiotic X-948 have reached 0·2 g/l. Its activity against our test organism in a cylinder plate assay is 1500 units per mg, where 1 unit per ml is the concentration required to produce a 20 mm zone of inhibition on agar plates seeded with E bacillus. The activity of antibiotic X-1008 against E bacillus is 1000 units per mg.

Antibiotic X-948 was found by SCHNITZER[5] to have an appreciable trypanocidal effect in mice. It was, however, very toxic. Mr. B. TABENKIN and Dr. J. M. COOPERMAN of our laboratories found that crystalline antibiotic X-948 is markedly toxic when fed at a dietary concentration of 0·01% to young chicks.

For the large scale preparation antibiotic X-948 was extracted with butyl acetate from cells, which were separated by filtration from the acidified (pH 4–5) fermentation broth of *Streptomyces* X-948. The extract was concentrated *in vacuo* and diluted with petroleum ether. The precipitate was dissolved in chloroform and treated with charcoal. The solution was then diluted with methanol and the chloroform removed by distillation at atmospheric pressure. Antibiotic X-948 crystallizes under these conditions in colorless prisms, melting at 236–238° (dec.) corr.;

$$[\alpha]_D^{23} = -308° \pm 5° \ (c = 1{\cdot}2\% \text{ in } CHCl_3).$$

The UV. absorption spectrum is practically identical with that published for Echinomycin[1]. The IR. spectrum is very similar[2]. The average of many analyses of antibiotic X-948 was: C, 55·19; H, 5·94; N, 15·22; O, 17·51; S, 5·54. Calculated for $C_{29}H_{39}O_7N_7S$: C, 55·31; H, 6·24; N, 15·57; O, 17·79; S, 5·09[6].

On refluxing antibiotic X-948 with 0·4 *N* barium hydroxide, 1 mole of ammonia was evolved and the barium salt of quinoxaline-2-carboxylic acid (about 1 mole) was precipitated. Quinoxaline-2-carboxylic acid (m.p. 209–211°) was liberated with acid and identified by analysis (calculated for $C_9H_6ON_2$: C, 62·01; H, 3·48, found: C, 62·09; H, 3·81), UV. spectrum (practically identical with that of X-948), and conversion into the methyl ester, melting at 114° (calculated for $C_{10}H_8O_2N_2$: C, 63·85; H, 4·25; N, 14·91, found: C, 64·22; H, 4·39; N, 14·86). Neither the acid nor the ester gave a melting point depression with synthetic preparations. The barium hydroxide solution was freed from barium ions and concentrated *in vacuo*. The residue was dissolved in methanol and crude N-methyl-L-valine precipitated with isopropanol. Recrystallized from a mixture of water, methanol and acetone, this amino acid forms flat needles, subliming at 200° without melting (calculated for $C_6H_{13}O_2N$: C, 54·94; H, 9·99; N, 10·68, found: C, 55·13; H, 9·89; N, 10·49);

$$[\alpha]_D^{25} = +15{\cdot}1 \ (c = 3\%, H_2O); \ [\alpha]_D^{25} = +31{\cdot}0 \ (c = 1{\cdot}4, 5N \text{ HCl})[7].$$

Antibiotic X-948 was also hydrolyzed by refluxing for 5 h with 5·5 *N* HCl. The mixture was concentrated, diluted with water and extracted with ether[8]. The aqueous solution was filtered and reacted with 2,4-dinitrochlorobenzene at 80°. The reaction products were extracted with ether and the extract was concentrated *in vacuo*. The residual orange oil (1 part) was dissolved in ether, diluted with the same volume of petroleum ether, and adsorbed on a distribution column, prepared by suspending a mixture of 30 parts of silica gel (100–200 mesh), 10 parts Hyflo Super-cel, 10 parts of 1 molar pH 8 potassium phosphate buffer in ether-petroleum ether (50:50). The column was eluted with mixtures of ether and petroleum ether (1:1 and 9:1), saturated with the above buffer. The first fraction yielded 2,4-dinitrophenyl-N-methyl-L-valine, melting at 181–184°;

$$[\alpha]_D^{27} = +495° \pm 10° \ (c = 0{\cdot}65\% \text{ in chloroform}).$$

Calculated for $C_{12}H_{15}O_6N_3$: C, 48·48; H, 5·09; N, 14·14, found: C, 48·92; H, 5·45; N, 14·39. A mixed melting point with a preparation obtained by PLATTNER and NAGER from Enniatin B gave no depression[9]. The second fraction yielded about 0·75 moles of 2,4-dinitrophenyl-L-alanine, melting at 176–177°;

$$[\alpha]_D^{26} = +10{\cdot}5° \pm 2° \ (c = 2 \text{ in absolute ethanol}[10]).$$

[4] *Streptomyces sp.* X-948 was isolated from a soil sample obtained in Shreveport, La., U.S.A., X-537 from a soil sample of Hyde Park, Mass., U.S.A., and X-3565, X-3593, and X-3600 from three different soil samples of Colombia, S.A.

[5] R. J. SCHNITZER, Ann. N. Y. Acad. Sci. *55*, 1090 (1952).

[6] Suggested for Echinomycin: $C_{29}H_{37}O_7N_7S$. Other formulas, such as $C_{25}H_{32}O_6N_6S$, would also fit our analytical results.

[7] PL. A. PLATTNER and U. NAGER, Helv. chim. Acta *31*, 2192 (1948), report + 17·5° (H_2O) and + 30·9° (5*N* HCl).

[8] Quinoxaline-2-carboxylic acid was never found in such hydrolysates. Since quinoxaline-2-carboxylic acid is stable under our acid hydrolysis conditions, we are inclined to believe that its formation by the degradation of antibiotic X-948 with alkali is not due to a simple hydrolysis of an ester or amide linkage, in spite of the great similarity of the UV. absorption spectra of both compounds.

[9] PL. A. PLATTNER and U. NAGER, Helv. chim. Acta *31*, 665 (1948), report m.p. 181·5–182°; $[\alpha]_D^{19} = +482{\cdot}5°$ ($c = 0{\cdot}716\%$ in chloroform). We are indebted to Prof. PLATTNER for a sample of their 2,4-dinitrophenyl-N-methyl-L-valine.

[10] It was found that the $[\alpha]_D$ of 2,4-dinitrophenyl-L-alanine in ethanol varied considerably, depending on the amount of water present: + 18·0° ± 1° in 95% ethanol, and + 21·0° ± 1·5° in 80%

Calculated for $C_9H_9O_6N_3$: C, 42·36; H, 3·56, found: C, 42·44; H, 3·46. The sample was found to be identical with a 2,4-dinitrophenyl derivative prepared from commercial L-alanine. A third fraction was obtained after extrusion of the column. The upper part of the column (yellow) was extracted with methanol. The methanol solution was concentrated *in vacuo* to a small volume. Yellow crystals of a potassium salt precipitated. After acidification in aqueous solution, 2,4-dinitrophenyl-D-serine (m.p. 177–178°) was obtained (yield 0·58 moles);

$$[\alpha]_D^{26} = -4{\cdot}3° \pm 0{\cdot}6° \ (c = 1{\cdot}5\% \text{ in absolute ethanol}^{10}).$$

Calculated for $C_9H_9O_7N_3$: C, 39·87; H, 3·35, equivalent weight 283, found: C, 40·02; H, 3·40, equivalent weight by potentiometric titration, 283, 286. The sample was compared with the 2,4-dinitrophenyl derivative prepared from commercial L-serine. The melting point was the same, the rotation opposite[10]. The racemate prepared from equal amounts of the 2,4-dinitrophenyl derivative of L-serine and our D-serine derivative was in every respect identical with the 2,4-dinitrophenyl derivative prepared from commercial racemic serine[11].

Antibiotic X-1008 was isolated from a submerged culture of *Streptomyces sp.* X-1008 by extracting the whole broth with butanol. The extract was concentrated *in vacuo* and the antibiotic precipitated with petroleum ether. It was successively extracted into methylene chloride and methanol, and then crystallized from a mixture of ethanol and acetonitrile. Antibiotic X-1008 forms cube-like crystals, melting with decomposition at 209–216° (corr.);

$$[\alpha]_D^{27} = -282° \ (c = 1\%, \text{ chloroform}).$$

It gives a melting point depression when mixed with antibiotic X-948. Its UV. absorption spectrum is practically identical with that of antibiotic X-948 and shows the presence of the quinoxaline residue. Barium hydroxide hydrolysis gives quinoxaline-2-carboxylic acid. The IR. spectrum is similar, but differs in details from that of antibiotic X-948. The analyses point to the formula $C_{29}H_{38}O_7N_6S$ (calculated: C, 56·66; H, 6·23; N, 13·67; S, 5·22, found: C, 56·40; H, 6·52; N, 13·69; S, 5·08). These results show that antibiotic X-1008 is structurally related to antibiotic X-948. However, there are only 6 nitrogens in its molecule, as against 7 in antibiotic X-948, indicating that the side chain attached to the quinoxaline residue is of a different nature.

Antibiotic X-1008 is, like antibiotic X-948, a highly toxic compound. It is, however, devoid of trypanocidal activity in mice, when given at the tolerated dose[12].

We are indebted to Dr. Al. Steyermark and his staff for the microanalyses and to Dr. A. Motchane and his staff for the spectroscopic data.

J. Berger, E. R. La Sala, W. E. Scott, B. R. Meltsner, L. H. Sternbach, S. Kaiser, S. Teitel, E. Mach, and M. W. Goldberg

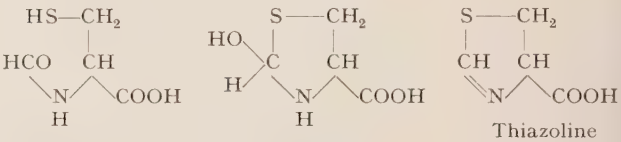
Research Laboratories, Hoffmann-La Roche, Inc. Nutley, New Jersey, USA., June 24, 1957.

Zusammenfassung

Es werden zwei neue, chemisch verwandte Streptomyces Antibiotika beschrieben, X-948 ($C_{29}H_{39}O_7N_7S$?) und X-1008 ($C_{29}H_{38}O_7N_6S$?). X-948 ist wahrscheinlich identisch mit Echinomycin. Es hat sehr ähnliche physikalische Eigenschaften und gibt die gleichen Abbauprodukte (Ammoniak, 2-Chinoxalincarbonsäure, N-Methyl-L-valin, L-Alanin und D-Serin).

Thiazoline Carboxylic Acid from Formylcysteine

Calvin[1] discovered that glutathione (GSH) dissolved in 12 *N* HCl gives the spectrum of a thiazoline derivative with a maximum at 268·5 mμ. By spectrometric evidence a thiazoline derivative was presumed to be produced in the course of the metabolism of thiazolidine carboxylic acid by rat liver preparations[2]. It seemed of interest to assay whether the treatment of N-formylcysteine (FC) with strong acid is followed by the ring closure to a thiazoline derivative in a manner similar to the behaviour of GSH. The expected reaction should follow the steps indicated below:



Formylcysteine — Intermediate ? — Thiazoline carboxylic acid

FC was prepared starting from diformylcystine[3] by the same method used by Pirie and Hele for the preparation of acetylcysteine[4]. It was dissolved in HCl of increasing normality and the O.D. at 268·5 mμ was registered against the same solvent in function of time.

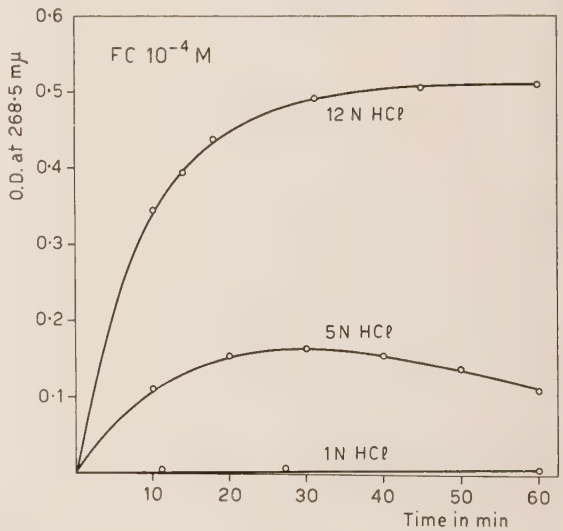


Fig. 1.—Optical density of formylcysteine dissolved in HCl of different strengths at 268·5 mμ, in function of time.

ethanol. The 2,4-dinitrophenyl derivatives of D- and L-serine showed a similar behavior: $-4{\cdot}3° \pm 0{\cdot}5°$ and $+4{\cdot}4° \pm 0{\cdot}3$, respectively, in 100% ethanol, $-12{\cdot}1° \pm 1{\cdot}5°$ and $+13{\cdot}0° \pm 2°$, respectively, in 95% ethanol, and $-16{\cdot}0° \pm 1°$ for the D-form in 90% ethanol.

[11] R. R. Porter and F. Sanger, Biochem. J. *42*, 287, (1948).

[12] Personal communication by Dr. R. J. Schnitzer of our Chemotherapy Laboratories.

[1] M. Calvin, *Symposium on Glutathione* (Academic Press, New York 1954).

[2] D. Cavallini, C. De Marco, B. Mondovì, and F. Trasarti, Biochim. biophys. Acta *22*, 558 (1956).

[3] V. du Vigneaud, R. Dorfmann, and H. S. Loring, J. biol Chem. *98*, 577 (1932).

[4] N. W. Pirie and T. S. Hele, Biochem. J. *27*, 1716 (1933).

Figure 1 shows that with the higher concentration of HCl an increase of density is produced, reaching a steady state after 60 min. With the lower concentration of HCl the increase is slower with 5 *N* and nil with 1 *N*. That the production of a thiazoline is dependent on time also for

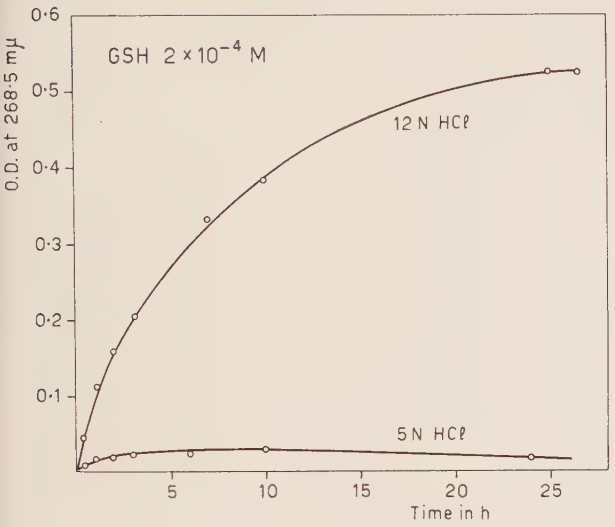


Fig. 2.—Optical density of glutathione dissolved in HCl of different strengths at 268·5 mμ, in function of time.

GSH is shown in Figure 2, which suggests, at the same time, that the behaviour of FC in 12 *N* HCl is of the same type as for GSH, when allowance is made for a difference in speed.

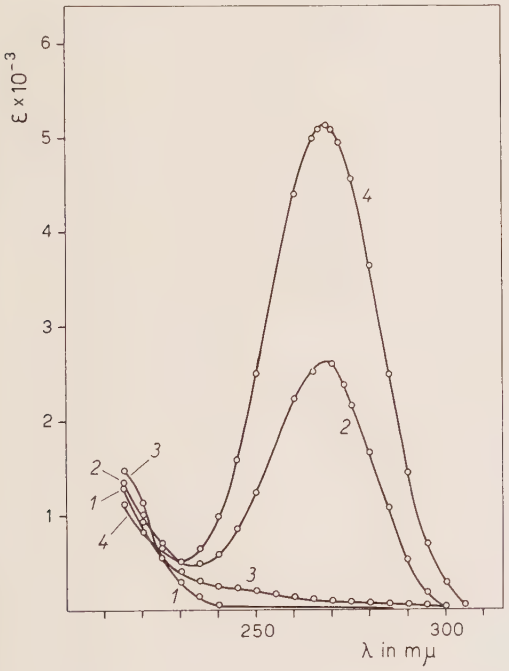


Fig. 3.—Spectrometric curves of glutathione: 1, in water; 2, in HCl 12 *N*; and formylcysteine: 3, in water; 4, in HCl 12 *N*; when the O.D. at 268·5 mμ has reached the maximum (see Fig. 1 and 2).

The complete spectrophotometric curve of FC and GSH in water and 12 *N* HCl, when the higher density at 268·5 mμ is reached, is reported in Figure 3. The curves for FC and GSH have the same shape and equal maximum, suggesting that an equal kind of reaction has taken place for both the compounds. Only a difference in the molar extinction is noted: 5180 for FC and 2625 for GSH.

A sample, of unknown purity, of thiazoline-4-carboxylic acid was prepared as follows. 200 mg of FC were dissolved in 1 ml 12 *N* HCl and left to evaporate over P_2O_5 and KOH pellets in a dessiccator evacuated by a water pump. After a night at room temperature, a mass of crystals was recovered which was rubbed with about 10 ml absolute ethanol and filtered. The insoluble part, which consisted of 20–30 mg of elongated crystals, was dried in vacuum. When dissolved in 12 *N* HCl the compound gave immediately the typical curve shown in Figure 4, with no increase of O.D. at 268·5 mμ with time. The product dissolved in Na_2PO_4 0·1 *M* (pH ca. 8·5) did not give the nitroprusside test for —SH (under the same condition either FC and cysteine gave a strong immediate reaction). The nitroprusside test was positive only when the compound was dissolved in concentrated ammonia and the nitroprusside solution added after a while. These are indications that the thiazoline ring is already present in the compound, that the —SH group is not free, and that it becomes free after hydrolysis in strong ammonia.

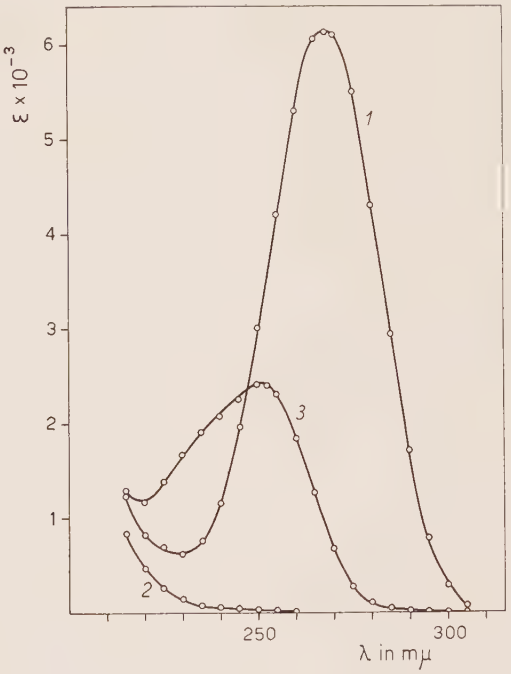


Fig. 4.—Spectrometric curves of thiazoline carboxylic acid, prepared as described in the text: 1, in HCl 12 *N*; 2, in water; 3, in phosphate buffer 0·1 *M* pH 7·4.

The curves in 12 *N* HCl, in water, and in 0·1 *M* phosphate buffer pH 7·4, of the compound prepared as described above, are reported in Figure 4. It is interesting to note that no absorption is shown in water and that at pH 7·4 the maximum is depressed and shifted to the shorter wavelengths. The lack of absorption in water is probably due to hydrolysis of the thiazoline ring in dilute acid medium[5]. Indeed solutions of thiazoline carboxylic acid are acidic and the curve in 5 *N* HCl of Figure 1 suggests that in a not concentrated solution of HCl the production of the thiazoline ring is followed by its rupture.

[5] G. Préaux and R. Lontie, Biochem. J. *66*, 26 p (1957).

The maximum and shape of the curve of thiazoline carboxylic acid in phosphate buffer near the neutrality are very similar to those found for the metabolic product of thiazolidine carboxylic acid by liver preparations[2]. This finding strengthens the hypothesis that a thiazoline derivative is the first product of the biological oxidation of thiazolidine carboxylic acid.

D. Cavallini, B. Mondovì, and C. De Marco

Institute of Biological Chemistry of the University of Rome and Centro di Enzimologia del C.N.R., Rome (Italy), June 29, 1957.

Riassunto

La formilcisteina in HCl 12 *N* dà un assorbimento nell'ultravioletto indicante la formazione di un anello tiazolinico. La reazione è più rapida per la formilcisteina che per il glutatione e dipende dalla concentrazione dell'acido. Trattando la formicilsteina con HCl 12 *N*, è stato preparato un composto avente le proprietà dell'acido tiazolin carbossilico, che in soluzione di fosfati a pH 7,4 dà una curva spettrofotometrica sovrapponibile a quella ottenuta in un precedente lavoro da un metabolita dell'acido tiazolidin carbossilico. Questo risultato avvalora l'ipotesi che il fegato di ratto è capace di ossidare l'anello tiazolidinico a tiazolinico.

Biochemical Studies on the Degradation Products of Diazinone

During chemical and biochemical studies on some organophosphorus insecticides[1], it was found that diazinone (O,O-diethyl O,2-*iso*propyl-4-methyl-pyrimidyl thionophosphate) is degradated to various derivatives by chemical and other means. It was also observed that plants sprayed with diazinone contained biochemically active residues even after comparatively long periods of time. The results of these experiments are reported in the following:

Methods and material[2]. Plants (*Impatiens balsami*) were sprayed with a 0·02% aqueous diazinone solution, approximately 100 ml per m². Samples (3·5 g of fresh leaves) were taken after various periods of time, and homogenized in water (10 ml). The homogenates were analysed for chemical activity by measuring the cholinesterase-inhibiting effect on an acetylcholine-cholinesterase system with the Warburg technique[3]. The enzyme used was a purified preparation from human blood serum. Before the addition of substrate (acetylcholine chloride), the enzyme was incubated for 50 min with the extracts. Samples taken from unsprayed plants and treated in the same way were used as controls.

Paper chromatograms of various diazinone preparations were carried out with filter paper (Munktell OB) impregnated with silicone or vaseline from a 5% hexane or benzene solution, and air dried. The solvent used was the upper phase from a mixture containing water-ethanol-chloroform (6:10:10)[4]. After air drying, the paper was developed by spraying first with a N-bromo-succinimide solution (0·09 g in 50 ml chloroform and afterwards diluted 1:5 with the solvent) and then with a fluorescein solution (0·33 g in 100 of 0·1 *N* NaOH and afterwards diluted 3:100 with ethanol)[5]. The colour development could only be favorably performed when the paper was treated with vaseline.

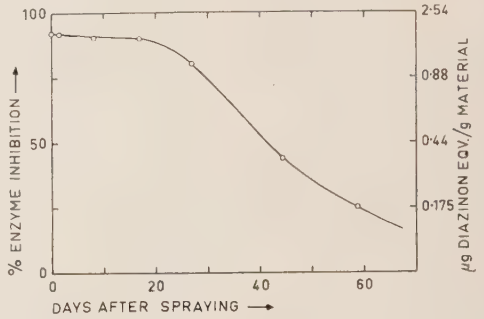


Fig. 1.—Biochemical effect of residues in plants sprayed with diazinone.

Chromatograms not sprayed with the colour reagents were used to study the cholinesterase inhibition by separated constituents. The chromatogram was cut into sections of the same size, usually 20 sections from the starting point to the solvent front, and extracts of each section were made in a bicarbonate buffer solution (the same solution as used in enzyme activity determination[3]). Cholinesterase inhibition by these extracts was assayed using the technique mentioned above. The location of active constituents thus obtained (Fig. 3) was evaluated as per cent enzyme inhibition by each section of the chromatogram, and compared with a chromatogram developed with the colour reagents.

Analysis of residues from diazinone-sprayed plants. The first sample of the plant sprayed with diazinone was taken 1 h after spraying, followed by sampling during one to two months (duplicate series of experiments carried out). The results obtained from one of these experiments are recorded in Figure 1. They indicate that 50% of the active components was present 25 days after spraying. After 9 weeks, the activity of the residues was approximately 20% of the original biochemical activity, corresponding to approximately 0·15 µg of diazinone equivalents per gram plant material. The original amount of diazinone (based on the amount used in spraying) was approximately 10 µg/g material.

It is most probable that diazinone is easily isomerised or converted to analogues (e.g., by oxidation) in a way similar to that demonstrated for parathion[4]. Some of these isomers and analogues might be more active biochemically than diazinone, in the same way as was found for parathion. In order to find support for this view, the following experiments were performed.

Enzyme inhibition by diazinone preparations treated in various ways. The cholinesterase inhibiting activities of pure (99·9%) diazinone and of a one year old preparation containing 95% pure diazinone (chemical analysis) differed greatly, as demonstrated in Figure 2. Even after keeping for four months at room temperature, a preparation behaved much the same as the one year old prepara-

[1] K.-B. Augustinsson, Acta agr. Scand. *7*, 165 (1957).

[2] We are grateful to Dr. Siv Renvall of the Swedish Plant Protection Institute, Stockholm, for carrying out the spraying of the plants and taking samples for analysis. The diazinone preparations used were kindly supplied by Messrs. J. R. Geigy, Basel.

[3] K.-B. Augustinsson, Meth. biochem. Analysis *5*, 1 (1957).

[4] K.-B. Augustinsson and G. Jonsson, Acta chem. scand. *11*, 275 (1957).

[5] J. W. Cook, J. Ass. off. agric. Chem. Wash. *37*, 984 (1954).

tion. The enzyme inhibition was increased by heating a pure preparation for several hours at 140°C, and this increase in activity is assumed to be due to the formation

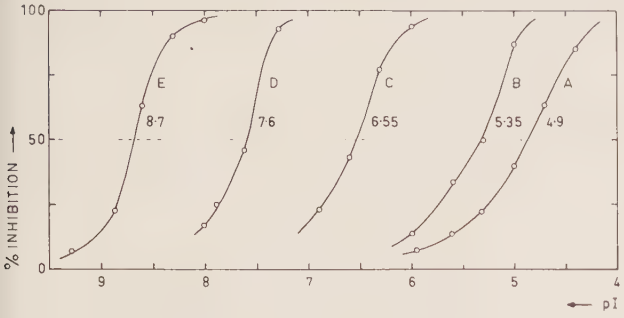


Fig. 2.—*In vitro* inhibition of cholinesterase activity (purified enzyme from human blood serum) by diazinone preparations treated in various ways. (*A*) Pure diazinone; (*B*) Pure diazinone heated for 65 h at 140°C; (*C*) One year old diazinone preparation (a precipitate present was removed before use); (*D*) and (*E*) Pure diazinone treated with bromine for 3 h (*D*) and tested immediately after the addition of bromine (*E*). pI = — log of molar inhibitor concentration (based on pure diazinone, mol. weight 303·35). Values inserted refer to 50% enzyme inhibition (pI_{50}).

of the S-ethyl isomer of diazinone. The *in vitro* inhibition was still more increased when pure diazinone was treated with dilute bromine water (1:2500). The reaction with bromine was instantaneous, and the greatest increase in inhibition was obtained when the mixture was tested as soon as possible after the addition of bromine. It is assumed that diazinone was thereby oxidised to its oxygen analogue, which is probably the active derivative *in vivo*. When diazinone was incubated with bromine water for longer periods of time, the inhibiting activity of the mixture was decreased. Incubation must be carried out in aqueous solution; in ethanol, diazinone was not oxidised by bromine. It is seen in Figure 2 that after the bromine treatment, the enzyme-inhibiting power was increased 10,000 times.

Paper chromatography. Pure and technical grade diazinone preparations as well as preparations heated or treated with bromine were analysed by paper chromatography. The chromatograms obtained with vaseline-treated paper were developed by spraying with N-bromosuccinimide-fluorescein, and those obtained with silicone-treated paper were evaluated by biochemical means. The results of some of these experiments are recorded in Figure 3. The R_f values obtained with the vaselin- and silicone-treated papers are not comparable, which may be noted when comparing the results shown in Figure 3 (*A* and *a*).

On a colour-developed chromatogram of pure (99·9%) diazinone preparation (*A*, *a*) only one spot was visible. Biochemical evaluation revealed two active constituents. On the other hand, six various constituents could be traced by the biochemical method on a chromatogram of an old preparation. It has not been possible to identify all these constituents, but some suggestions in this direction could be made, when the following experiments had been performed.

A pure diazinone preparation heated for 65 h at 140°C revealed only two spots (*C*; R_f 0·68 and 0·88). It is suggested that these correspond to the two fast-running constituents observed in the old preparation. One of the two constituents, probably that with R_f 0·88, is the S-ethyl isomer of diazinone; the other (R_f 0·68) may be the oxygen analogue of diazinone. The latter derivative was the predominant constituent in a mixture obtained after the treatment of diazinone with bromine water (*D*, Fig. 3).

We conclude, therefore, that the two constituents traced biochemically in a 'pure' diazinone preparation were diazinone (R_f 0·1) and its oxygen analogue (R_f 0·68), the latter probably being easily formed from the former even in contact with air. As to the identity of the three remaining constituents present in the old preparation (*B*, Fig. 3), no answer can be given before testing other possible analogues or isomers of diazinone, e.g., the S-pyrimidyl isomer, the bis-pyrimidyl analogue, and others.

K.-B. Augustinsson and G. Jonsson

Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, University Stockholm (Sweden), May 3, 1957.

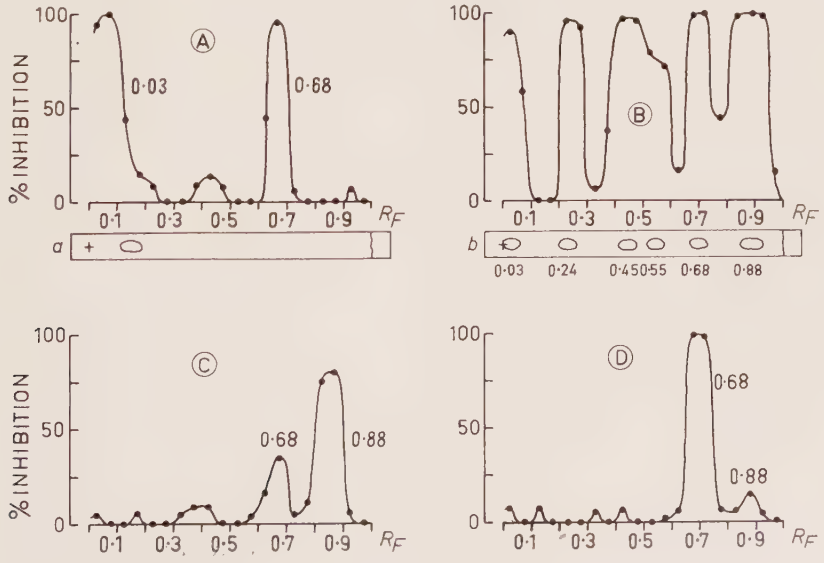


Fig. 3.—Cholinesterase inhibition by various sections of the paper chromatograms of pure (99·9%) diazinone (*A*), one year old diazinone (*B*), heated diazinone (65 h at 140°C) (*C*), and bromine-treated diazinone (*D*). Silicone treated paper used, except for the colour developed chromatogram (*a*) of pure diazinone when vaseline-treated paper was used instead. The R_f values of all constituents observed are noted on a 'hypothetical' chromatogram (*b*).

Zusammenfassung

Pflanzen, die mit Diazinon gespritzt wurden, enthalten biochemisch aktive Rückstände des Insektizids auch nach vergleichsweise langer Zeit; 50% der aktiven Stoffe waren vorhanden 25 Tage nach der Spritzung; 20% der ursprünglichen biochemischen Aktivität wurden noch nach 9 Wochen festgestellt.

Reines (99,9%) Diazinon enthielt ausser dem Diazinon eine andere cholinesterasehemmende Substanz, wahrscheinlich identisch mit dem Sauerstoffanalogon des Diazinons. In einem ein Jahr alten reinen Diazinonpräparat konnten 6 Komponenten papierchromatographisch nachgewiesen werden. 3 Bestandteile einer derartigen Mischung konnten identifiziert werden: Diazinon, sein Sauerstoffanalogon und sein S-ethylisomeres. Die beiden letzteren wurden wahrscheinlich bei der Behandlung von Diazinon mit Brom bzw. bei seiner Erhitzung auf 140°C als Hauptprodukte gebildet.

Demonstration of Specific and Non-specific Agglutinogens in the Normal Bone Marrow Erythroblasts

The presence in the bone marrow erythroblasts of agglutinogens (specific and non-specific) similar to those of the mature erythrocytes, though theoretically intuitive, has up to now been suggested only indirectly. For instance, Björkman[1] reports the agglutinability of erythremic cells by influenza virus and by a serum containing cold agglutinins, and Wagner[2] that of erythroblasts of the rat by an anti-rat-erythrocytes serum. More recently Pisciotta and Hinz[3], using circulating erythroblasts in a case of acquired haemolytic anaemia, have shown that they agglutinate with group-specific sera, and with sera containing autohaemo-agglutinins.

The problem is especially interesting in relation to the suggested bone marrow involvement in course of immunohaemolytic syndromes: the bone marrow vulnerability in such pathological conditions, demonstrated by several different studies (Gasser[4], Sacchetti, Rossi, and Diena[5]), would be supported by the finding of erythroblastic agglutinability.

The present work has been then directed to establish:

(1) whether group-specific antigens exist in the normal bone marrow erythroblasts, and the stage of their appearance in the cells; and

(2) whether the erythroblasts are agglutinated by non-specific agglutinating sera.

The erythroblasts of the bone marrow have been separated by a fractionated centrifugation technique (Bracco, Curti, and Masera[6]), modified with the addition of Polyvinylpyrrolidone, which makes it possible to obtain in a short time (15 min from the bone marrow puncture) an erythroblastic suspension of 90–95%. For the agglutination tests with grouping sera, a drop of the agglutinating serum was added, in serological tubes, to a drop of an erythroblastic suspension at 40–50% in saline.

For sera containing auto-antibodies, the erythroblasts, at 2–4% in saline, were added to equal volumes of serum.

The readings of the agglutination, after incubation at the appropriate temperature for not longer than 30 min to avoid cellular damage, were taken macro- and microscopically.

In case of incomplete antibodies, compatible normal serum was added to the erythroblasts-serum-mixture, and the readings were taken as above.

All glassware used was siliconated.

Table I shows the results of some experiments of agglutination of normal erythroblasts by group-specific sera: the results obtained were in complete agreement with those obtained when mature erythrocytes of the same subjects were used instead of bone marrow erythroblasts.

Table I

Case No. 1		Case No. 2		Case No. 3	
Anti-A	–	Anti-A	+	Anti-A	–
Anti-B	–	Anti-B	–	Anti-B	+
Anti-M	+	Anti-M	–	Anti-M	+
Anti-N	–	Anti-N	+	Anti-N	+
Anti-D	+	Anti-D	–	Anti-D	+
Anti-Lewis Le^a	–	Anti-Lewis	+	Anti-Lewis	–
Anti-Lutheran Lu^a	+	Anti-Lutheran	–	Anti-Lutheran	+

+ denotes agglutination; – denotes no agglutination.

Inspection of the agglutinates, in freshly made preparations carefully observed with phase-contrast microscopy, or after staining of the slides, made it possible to recognize the presence of basophilic erythroblasts also in the earlier phases.

Table II

Agglutinating sera	Type of antibody	Optimal temperature	Agglutination
1	Incomplete	37	+
2	Incomplete	37	+ + +
3	Incomplete	20	+ +
4	Complete	4	+ + + +
5	Complete	20	+ + + +
6	Complete	4	+ + +

+, ++, +++, ++++ denote varying degrees of agglutination.

Table II shows the results of erythroblastic agglutination by sera containing auto-antibodies, cold and warm type, complete and incomplete form.

Our observations indicate that the bone marrow erythroblasts possess group-specific antigens similar in all respects to those found on the mature erythrocytes. Such antigens are present also in the most immature basophilic erythroblasts: this fact demonstrates that the presence of antigens is unrelated to the appearance of haemoglobin in the cells. The demonstration that the erythroblasts are strongly agglutinated by sera containing auto-antibodies of different type seems to be significant: this suggests that, during the immunohae-

[1] S. E. Björkman, Acta haematol. *11*, 189 (1954).

[2] K. Wagner, 5th Congr. Europ. Soc. Haematol. *1955*, 593.

[3] A. V. Pisciotta and J. E. Hinz, Proc. Soc. exper. Biol. Med. N. Y. *91*, 356 (1956).

[4] C. Gasser, Sang *26*, 6 (1955).

[5] C. Sacchetti, V. Rossi, and F. Diena, Boll. Soc. ital. Ematol. (to be published).

[6] M. Bracco, P. C. Curti, and N. Masera, Acta haematol. *6*, 91 (1951).

molytic process, the antibody may attach itself directly not only to the circulating red cells but also to the bone marrow normoblasts, thus causing the bone marrow impairment demonstrated by different studies (Gasser[4], Sacchetti, Rossi, and Diena[5]).

This possibility refers to complete and incomplete antibodies, and also to antibodies acting optimally *in vitro* at temperatures below 37°C.

V. Rossi, F. Diena, and C. Sacchetti

Institute of Medical Pathology, University of Genoa (Italy), April 29, 1957.

Zusammenfassung

Es wurde untersucht, ob die Erythroblasten im menschlichen Knochenmark spezifische und unspezifische Antigene, entsprechend den Erythrozyten, besitzen. Diese Eigenschaft wurde auch bei den unreifsten basophilen Erythroblasten beobachtet.

Differences in the Desoxyribonucleoprotein Complex of Normal and Leukemic Human Lymphocytes

The biochemical findings of Mirsky and Ris[1] indicate that histone occurs in constant quantitative ratio to DNA in cell nuclei of the same animal species.

Alfert and Geschwind[2], using an original staining method, observed that the nuclear content of the histone stained with Fast green at pH 8 is in constant ratio with corresponding nuclear content of Feulgen stained DNA.

These findings have been confirmed by us, in rat and normal human lymphocytes[3].

In proliferating tissues, such as young rat liver cells[4] and granuloblasts of normal human bone marrow[5], the Feulgen/Fast green ratio was found to be markedly lower, presumably[4] due to a higher Fast green stainability of the histone during nuclear synthesis of desoxyribonucleoprotein.

In order to check the behaviour of the nucleoprotein complex in leukemic nuclei, cytophotometric determinations of the Feulgen stained DNA and the Fast green stained histone were carried out in the lymphocytes of four cases of lymphatic leukemia.

[1] A. E. Mirsky and H. Ris, J. gen. Physiol. *34*, 475 (1951).

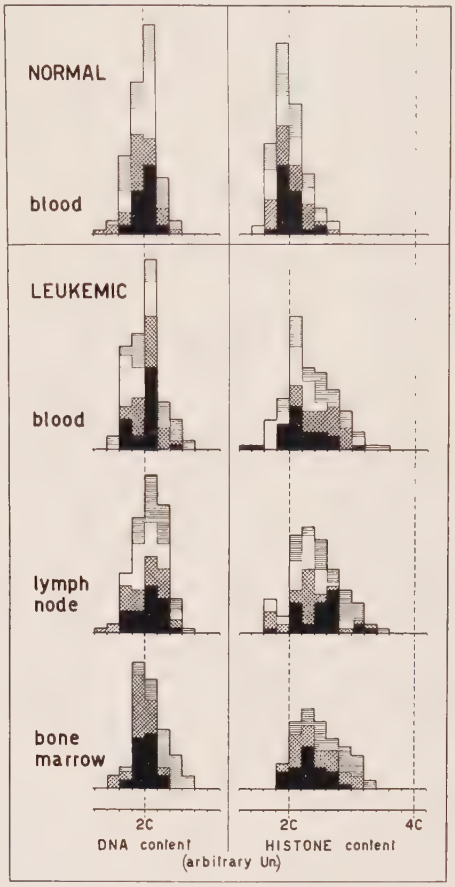
[2] M. Alfert and I. I. Geschwind, Proc. nat. Acad. Sci. *39*, 991 (1953).

[3] S. Perugini, U. Torelli, and M. Soldati, Riv. Istochim. norm. pat. *2*, 449 (1956); Riv. Istochim. norm. pat. *3*, 1 (1957).

[4] D. P. Bloch and G. C. Godman, J. biophys. biochem. Cytol. *1*, 531 (1955). – S. Perugini, U. Torelli, and M. Soldati, Riv. Istochim. norm. pat. *2*, 449 (1956).

[5] S. Perugini, U. Torelli, and M. Soldati, Riv. Istochim. norm. pat. *3*, 1 (1957).

The cytophotometric apparatus was that described by one of us, co-working with Vialli[6]; the Feulgen reaction was performed as described by Pollister[7]; the Fast green staining according to Alfert and Geschwind[2], as previously described[8].



Nuclear content of DNA and histone in lymphocytes of four normal subjects and of four cases of lymphatic leukemia. Values of each case are differently hachured and graphically exposed in function of the normal diploid (2 C) content. The data of bone marrow in one case are missing. In ordinate nuclear frequency; scales are linear.

The measurements were made in blood, bone marrow and lymphnode smears of leukemic subjects, and in normal blood smears, stained simultaneously (Figure).

Mean values, obtained in *blood smears* by thirty determinations in each case, are summarized in the Table.

The Table and the graphic show that the Fast green stained histone content of the leukemic cells is greater

[6] M. Vialli and S. Perugini, Riv. Istochim. norm. pat. *1*, 149 (1954).

[7] A. W. Pollister, Rev. Hémat. *5*, 527 (1950).

[8] S. Perugini, U. Torelli, and M. Soldati, Riv. Istochim. norm. pat. *2*, 449 (1956).

	DNA		Histone	
	Normal	Leukemic	Normal	Leukemic
Case 1	9·99 ± 0·12	9·85 ± 0·16	10·08 ± 0·15	10·92 ± 0·30
Case 2	9·84 ± 0·23	10·33 ± 0·21	9·99 ± 0·23	12·90 ± 0·32
Case 3	10·03 ± 0·13	9·42 ± 0·18	10·05 ± 0·30	10·62 ± 0·22
Case 4	9·90 ± 0·23	10·90 ± 0·36	9·88 ± 0·18	12·36 ± 0·31

(Mean values ± standard error)

than that of normal lymphocytes, although the DNA values are similar in both cell categories, indicating the lack of a DNA movement in the pathological lymphocytes.

Our findings do not allow us to decide whether the decreased Feulgen/Fast green ratio in the leukemic lymphocytes is due to an absolute increase in histone, or to a modified Fast green stainability.

The biochemical observations of Cruft *et al.*[9], indicating the abnormal properties of histones from malignant cells, seem to support the latter hypothesis.

In any case, it seems that in leukemic lymphocytes the properties of the desoxyribonucleoprotein complex are different from those of normal lymphocytes.

A detailed account of this work, with statistical analysis of the data, will be published elsewhere.

Research supported by a grant of the Consiglio Nazionale delle Ricerche, Roma.

S. Perugini, U. Torelli, and M. Soldati

Institute of Medical Pathology, University of Modena (Italy), May 23, 1957.

Riassunto

Gli autori hanno determinato con metodo citofotometrico nel visibile il contenuto di acido desossiribonucleico (DNA) e di proteina istonica nei linfociti di 4 soggetti normali e di 4 pazienti affetti da leucosi linfatica.

I valori del DNA sono apparsi uguali nelle cellule normali e in quelle leucemiche, i valori dell'istone sono risultati in queste ultime superiori alla norma, onde il rapporto DNA/istone risulta essere nei linfociti leucemici inferiore a quello dei linfociti normali.

[9] H. J. Cruft, C. M. Mauritzen, and E. Stedman, Nature *174*, 580 (1954).

Muscle Adenylic Deaminase

After the discovery of adenylic deaminase by Schmidt[1], partially purified preparations of this enzyme have been described by a number of investigators[2]. Recently, the extensive purification and crystallization of this enzyme has been reported[3]. Most methods used for the preparation of the enzyme start with procedures which are ineffective in extracting the bulk of the enzyme[2]. The bulk of the adenylic deaminase is extractable only at high salt concentrations. The effect of increased concentration of salt upon adenylic deaminase extraction from acetone powders of tissues of several species is shown in the Table. As indicated in the Table, only after reaching molarities of 0·5 *M* and higher is the bulk of the enzyme extractable. Advantage has been taken of this, and of the denaturation and/or insolubilization of other enzymes by acetone treatment, to obtain with little effort an active preparation free of easily soluble enzymes and of myokinase. The procedure described here is intended to provide a simple reproducible preparation useful for analytical purposes. The data emphasizes the high level in skeletal muscle of this enzymatic activity.

Acetone powders of tissues are prepared by a standard procedure[4]. When kept at 0° in a dessicator they are stable for over 1 year. Some purification and concentration of the enzyme is accomplished as follows: Extract rabbit muscle acetone powder with 10 vol of water w/v for 10 min. All centrifugations were carried out at $5000 \times g$ and at 0°C. The ammonium sulfate solutions were saturated and adjusted to pH 7·4 at 0°C. All the steps of the fraction procedure were carried out at 0°C.

The effect of salt concentration upon the extractibility of adenylic acid deaminase

Species	Extracting medium				
	Water	0·2 *M* KCl	0·25*M* KCl	0·5 *M* KCl	1 *M* KCl
	Units/ml	Units/ml	Units/ml	Units/ml	Units/ml
Rabbit .	185	420	2200	4300	5500
Pigeon .	340	–	777	1200	1400
Chicken .	180	–	1000	1250	1400

Centrifuge and discard the supernatant fluid. Re-extract with 10 vol w/v of 0·2 *M* KCl and discard the supernatant fluid. Re-extract with 10 vol of 1 *M* KCl w/v twice and keep the supernatant fluids after centrifugation. The combined supernatant fluids have about 2000 units[5] and 7 mg protein per ml, thus yielding more than 20 times the enzyme activity, per gram muscle, of other procedures[5]. Add to the crude KCl extract ¼ vol of 0·6 *M* disodium phosphate and ⅓ vol saturated ammonium sulfate pH 7·4; discard the precipitate and precipitate the enzyme by adding ⅔ vol of ammonium sulfate. (All vol refer to the initial volume of the crude KCl extract. The recovery is from 90–95% and the specific activity is increased approximately 2 fold e.g. 600–700[5]. Conway[6] observed that saline was more effective than water for the extraction of the enzyme, however he did not explore further the effect of high concentrations of salts. He also showed that the adenylic deaminase appeared to have a very low affinity for the substrate and he discussed the possible existence of inhibitors. Whether the adenylic deaminase present in the preparation here described possesses tightly bound inhibitors is not known. The addition of crude acetone powder extracts with little adenylic acid deaminase activity, e.g. heart, is not inhibitory; however, when comparing activity at several dilutions, we have observed an apparent higher activity at higher dilutions of the enzyme. We have observed that when using initial velocities and less than 10–20% substrate utilization, there is essentially a doubling of rate by doubling the substrate concentration between 2×10^{-5} *M* and 2×10^{-3} *M*. This is in sharp contrast with the data of Nikiforuk and Colowick[5] but in agreement with the data of Conway and Cook[6].

From the activity measurements shown in the Table it has been calculated that at 37°, pH 6·4[5] and 4×10^{-5} *M* 5-adenosine monophosphate, a gram of muscle can deaminate over 15 micromoles 5-adenosine monophosphate/min and this figure would be higher at higher concentrations of 5-adenosine monophosphate. It ap-

[1] G. Schmidt, Z. physiol. Chem. *179*, 243 (1928); *208*, 185 (1932); *219*, 191 (1933).

[2] H. M. Kalckar, J. biol. Chem. *167*, 429, 461 (1947). – G. Nikiforuk and S. P. Colowick, J. biol. Chem. *219*, 119 (1956).

[3] Ya-pin Lee, Fed. Proc. *15*, 298 (1956); *16*, 210 (1957).

[4] S. Grisolia, in Colowick and Kaplan, *Methods in Enzymology* (Academic Press Inc., 1955), vol. II, p. 350.

[5] G. Nikiforuk and S. P. Colowick, J. biol. Chem. *219*, 119 (1956).

[6] E. T. Conway and R. Cooke, Biochem. J. *33*, 479 (1939).

pears, then, that the adenylic acid deaminase activity of muscle is as high or higher than the ATP-ase activity[7].

Acetone powders of skeletal muscle of rabbit and pigeon and chicken (breast muscle) were extracted for 10 min with 10 vol w/v of extracting medium and centrifuged. The supernatant fluids were then tested at 25° under the conditions described by NIKIFORUK and COLOWICK[5]; succinate buffer pH 5·9, and 4×10^{-5} *M* 5-adenosine monophosphate. Units are expressed as 0·001 O.D. decrease/min at 265 mμ. In addition the range of the assay was extended some 500 fold for substrate concentration by either inserting a spacer in the Beckman cells so as to reduce the light pathway from 10 mm to 1 mm and/or reading the O.D. changes at 288 mμ. At this wavelength 5-inosine monophosphate has about twice the molar extinction coefficient of 5-adenosine monophosphate. As discussed in the text, substrate saturation with crude extracts of adenylic deaminase appears to occur at extremely high concentrations. The studies at high substrate concentration were conducted to the test activities of acetone powder extracts of heart of all species included in the table. Even at high substrate concentrations we detected only very faint activity, less than $^1/_{10000}$ amount present in skeletal muscle. Also extracts of pigeon liver acetone powder contain small amounts of activity, about twice as much as heart.

We are indebted to Miss BARBARA JOYCE for help with some of the work presented here. Supported by Grants from the Life Insurance Medical Research Fund and the Kansas Heart Association.

N. ITO* and S. GRISOLIA**

McIlvain Laboratories, Department of Medicine, University of Kansas Medical Center, Kansas City, June 6, 1957.

Zusammenfassung

Der grössere Teil der Muskeldeaminase und Adenylsäure kann nur bei hohen Salzkonzentrationen extrahiert werden. Die Fähigkeit des Muskels für Adenyldeamination scheint grösser zu sein als seine ATP-ase-Kapazität. Beobachtungen über die Verteilung des Enzymes und seine Kinetik werden beschrieben.

[7] W. F. H. M. MOMMAERTS, in *Phosphorus Metabolism* (Edit. by MCELROY and GLASS, John Hopkins press, Baltimore 1951), Vol. I, p. 551.

* Haskell Fellow.

** Established Investigator of the American Heart Association.

Composition du suc de décongélation du muscle strié de la grenouille

La contracture de décongélation, que manifeste pendant son dégel un muscle strié *vivant* congelé, s'accompagne de l'exsudation massive d'un liquide riche en protéines[1]. Nous avons analysé ce liquide notamment par la méthode de l'électrophorèse[2] après une dialyse de 40 h contre les solutions de tampon de phosphates sodiques ($\mu = 0{,}10$, pH = 7,1) et de phosphates sodiques + NaCl ($\mu = 0{,}15$, pH = 7,2) utilisées dans ce laboratoire.

Le liquide a un pH légèrement acide, compris entre 6 et 6,5. Il renferme des phosphates, sous forme inorganique (74%), d'I.M.P. (16%) et d'hexoses-phosphates (6%): la répartition de ces composés est identique dans le jus et dans la pulpe[3].

Les vitesses moyennes des protéines de notre liquide de décongélation sont en -10^{-5} cm²/volt/cm, à $\mu = 0{,}10$, pH 7,1

Vitesses	*x*	*c*	*b*	*a'''*	*a''*	*a'*
Anodique . .	6,34	4,00	3,12	2,16	1,93	1,28
Cathodique .	5,73	–	2,36	1,48		0,99

et à $\mu = 0{,}15$, pH 7,2

Vitesses	*x*	*c*	*b*	*a'''*	*a''*	*a'*
Anodique . .	5,34	–	2,40	1,93	1,46	1,27
Cathodique .	5	–		1,64		

La concentration en protéines (mesurée au réfractomètre plongeant, à 25°, $\lambda = 589$ mμ, I = 0,00182% prot.) oscille entre 3,5 et 4,95%. Le liquide n'est ni visqueux, ni biréfringent et ne contient aucun représentant du groupe des myosines. Il est coloré en rose par l'hémoglobine du sang présent dans les muscles malgré leur rinçage au liquide de Ringer avant congélation. Aux pH d'électrophorèse, le gradient correspondant migre lentement vers la cathode ou reste immobile.

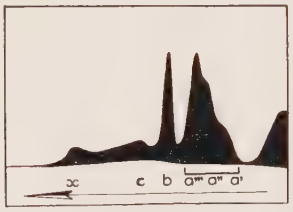


Fig. 1. Protéinogramme (compartiment anodique) d'un liquide de décongélation de muscles de grenouille après 16,300 s d'électrophorèse ($\mu = 0{,}10$, pH = 7,1, champ = 5,2 volt/cm, concentration protéine = 4,95%). Les gradients *x* et *c* peu marqués sont encore repérables; les gradients *a* et *b* sont distincts, *a* étant lui-même subdivisé en ses trois fractions (*a'*, *a''*, *a'''*). A droite, l'hémoglobine se superpose au gradient salin.

Les autres protéines présentes dans le liquide de décongélation appartiennent au groupe du myogène. On distingue quatre gradients identifiables par leurs vitesses de migration (Tableau) aux gradients *a*, *b*, *c* et *x* de DUBUISSON et JACOB[4].

Ces gradients sont d'importance variable. Leur séparation (compartiment anodique) est meilleure à la force ionique $\mu = 0{,}10$ (Fig. 1). Le gradient *a* est complexe et se scinde en trois composantes *a'*, *a''*, *a'''*; leur séparation reste cependant incomplète après 8 h d'électrophorèse ($\mu = 0{,}10$, pH = 7,15, champ = 5 volt/cm). Le gradient *b* est le second gradient important; il dépasse le gradient *a*. Le gradient *c* est peu marqué et s'étale

[1] J. GODEAUX, Arch. int. Physiol. *58*, 299 (1950).

[2] M. DUBUISSON, A. DISTÈCHE et A. DEBOT, Biochim. biophys. Acta *6*, 97 (1950).

[3] Nous remercions vivement Mme GOSSELIN-REY qui a eu l'obligeance de faire cette détermination.

[4] M. DUBUISSON et J. JACOB, Bull. Soc. Roy. Sci. Liège 145 (*1945*).

rapidement; il peut faire défaut. Le gradient *x* est un peu mieux représenté et reste repérable pendant toute l'expérience.

Quand on soumet un tel extrait à la dialyse contre de l'eau distillée, il se forme un précipité abondant (25%) de globuline X et de myogène dénaturé. Les protéinogrammes indiquent que ce précipité s'est fait aux dépens de *b*, de *a''* et de *c*, tandis que *a'*, *a'''* et *x* ne sont pas modifiés (Fig. 2).

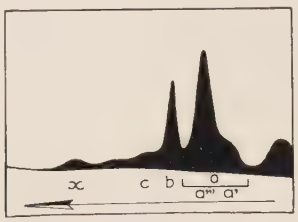


Fig. 2. Protéinogramme (compartiment anodique) du même liquide après dialyse préalable contre de l'eau distillée et élimination du précipité, puis dialyse contre un tampon phosphates sodiques –NaCl μ = 0,10, pH = 7,1 (16,400 s d'électrophorèse; champ: 5,23 volt/cm; concentration protéines: 3,72%). Si *x* n'a pas changé, *c* est nettement réduit; *b* a perdu une partie de ses constituants et *a* sa fraction moyenne *a''*.

En conclusion, le liquide exsudant du muscle en contracture de décongélation entraîne une quantité importante de protéines; celles-ci appartiennent au groupe des albumines et de la globuline X, à l'exclusion de tout représentant des myosines. La solution est plus concentrée que celle que l'on peut obtenir en extrayant la pulpe musculaire par une solution phosphatique.

J. Godeaux

Laboratoire de Biologie générale, Faculté des Sciences de l'Université de Liège, Fonds National Belge de la Recherche Scientifique, le 5 juillet 1957.

Summary

Because of cell membrane destruction, fluid escaping a muscle on thawing contains a large amount of proteins (myogen and globulin X). Whilst usual gradients *a*, *b*, and *c* are present in the fluid, the gradients *d* and *e* also occurring in extracts of unstimulated frog muscles are replaced by the gradient *x* already found in extracts of in N_2 exhausted muscles.

Inactivation of Catalase by Phospholipide Extracts

It was reported in a previous paper[1] that phospholipides extracted from yeast or from rat or rabbit liver form a precipitate when added to a solution of cytochrome *c*. The precipitate contains a large amount of cytochrome *c* and a phospholipide portion. The cytochrome *c* can be redissolved from the precipitate with ether, but its absorption spectrum is modified. Phospholipides from yeast or liver produce a precipitate also when added to a solution of iron salts such as ferrous sulphate or ferric ammoniacal citrate. It seemed then possible that phospholipide acts on the iron part of the molecule of cytochrome *c*. The present paper reports

[1] L. Michelazzi, Exper. *11*, 389 (1955).

Table I
Inhibition of crystalline beef liver catalase by phospholipide extracts

Phospholipide extract added	Microliters O_2 developed
Rabbit liver lecithin fraction	0
Rabbit liver sphyngomyelin fraction	65
Yeast lecithin fraction	10
Yeast sphyngomyelin fraction	10
Rat sarcoma lecithin fraction	12
Rat sarcoma sphyngomyelin fraction	140
None	467

Each value represents the mean of 3 experiments, with the exception of the value of the controls without phospholipide added, which represents the mean of 9 experiments.

the inhibition *in vitro* by phospholipides of catalase, an enzyme which contains bound iron.

Several investigations on the inhibition of this enzyme by tissue extracts have been reported. Hargreaves and Deutsch[2] have shown that tumor tissue exerts an inhibitory action on liver catalase. Greenfeld and Price[3] found a decrease of catalase activity in the liver of tumor-bearing animals. Ceriotti and Spandrio[4] have recently described that an inhibiting action on catalase is present not only in tumor, but also in normal tissues. Ceriotti, Spandrio, and Berti[5] reported in a further publication that several amino acids are able to inhibit catalase. Phospholipides used in the present investigation were prepared from yeast, from rat or rabbit liver, or from a rat spindle cell sarcoma (Galliera sarcoma), by the same method used in the previous work. Crystalline beef liver catalase was prepared according to the method of Summer and Dounce[6]. Catalase activity was determined at 37°C with Warburg manometers, by measuring the amount of oxygen liberated in 3 min from 3 ml of a $1^0/_{00}$ perydrol (Merck) solution. The enzyme (0·2 of a $1^0/_{00}$ solution) was added from the side arm of the Warburg flasks after 7 min preincubation. In the experiments in which the influence of phospholipide extracts was to be tested, 0·1 ml of the emulsion containing 100 mg phospholipide in 5 ml water was mixed with the enzyme in the side arm of the Warburg flasks.

The results are reported in Table I. It seems clear that phospholipide extracts from rabbit liver, from rat sarcoma, or also from yeast exert a strong inhibitory action on purified catalase. Yeast sphyngomyeline fraction is more active than that prepared from rabbit liver or from rat sarcoma. In other experiments, the influence of the *in vivo* treatment with phospholipides on catalase activity of the liver and of the kidney of guinea pigs was studied.

Guinea pigs weighing 300 g fed on a semi-synthetic diet were injected in the jugular vein with a dispersion of yeast lecithin fraction containing 100 mg of this substance. The animals were then killed by bleeding, 30 h after the injection. The livers and the kidneys were

[2] A. B. Hargreaves and H. J. Deutsch, Cancer Res. *12*, 720 (1952).

[3] R. E. Greenfeld and V. E. Price, J. biol. Chem. *209*, 363 (1954).

[4] G. Ceriotti and L. Spandrio, Biochim. biophys. Acta *18*, 303 (1955); Tumori *41*, 538 (1955).

[5] G. Ceriotti and Berti, Biochim. biophys. Acta *23*, 362 (1954).

[6] J. B. Sumner and A. L. Dounce, J. biol. Chem. *121*, 417 (1937); *127*, 439 (1939).

Table II
Catalase activity of the liver and the kidney of normal guinea pigs and guinea pigs injected with yeast lecithin fraction

Exp. No.	Animal	Liver μ l O_2	Kidney μ l O_2
1	Normal	299	62
2	Normal	292	61
3	Treated	302	72
4	Treated	300	61

immediately removed, transferred in the cold room at 2°C and weighed. The homogenates (100 mg tissue in 10 ml 0·25 *M* sucrose) were prepared in a Potter-Elvehjem glass apparatus, and then centrifuged at 1500g for 10 min. The supernatant after this centrifugation was diluted 500 times with water. 2·6 ml of this solution were used for the determination of enzyme activity. In these experiments, perydrol (0·3 ml of a 1% solution) was placed in the side arm of the flask and mixed with the enzyme after 7 min necessary for temperature equilibration. As Table II shows, no decrease of liver or kidney catalase activity was recorded in these experiments. The mechanism of the inhibition of purified catalase by phospholipide extracts *in vitro* is difficult to understand, but it seems possible that a reaction with the iron bound to the enzyme molecule is involved, as in the case of cytochrome *c*. It is impossible, in the experimental conditions used in this paper, to think that the inhibition is due to the presence of free amino acids in phospholipide extracts, because free amino acids were not revealed in this material by paper chromatography.

L. Michelazzi

Department of General Pathology of the University of Genoa (Italy), July 9, 1957.

Riassunto

L'autore, analogamente a quanto ha già dimostrato avvenire per il citocromo *c*, mette in evidenza una potente azione inattivante la catalasi da parte dei fosfolipidi estratti da tessuti e dal lievito.

Die Wirkung der Sulfationen auf das Membranpotential der isoliert durchströmten Säugetiermuskulatur

Isolierte Froschmuskel, in Natriumsulfatringer inkubiert, zeigen Erscheinungen (Fibrillationen, Nachkontrakturen bei direkter Reizung), die durch eine Herabsetzung der Kalziumionenkonzentration erklärt wurden (Frey[1]). Nach teilweisem Ersatz der Chlorid- durch Sulfationen in der Durchströmungsflüssigkeit isolierter hinterer Extremitäten von Katzen konnten wir jedoch kürzlich eine Reihe von Beobachtungen anstellen, die nicht allein mit einer dekalzifizierenden Wirkung der Sulfationen erklärt werden können; hierbei konnten wir zeigen, dass 1. unmittelbar nach der Umschaltung auf die sulfathaltige Durchströmungsflüssigkeit eine von der Höhe der Sulfatkonzentration abhängige zeitlich ziemlich konstante Steigerung der Kaliumfreisetzung aus der Muskulatur erfolgte (Kraupp *et al.*[2]), 2. gleichzeitig damit eine mehrere Minuten andauernde reversible Kontraktur der Muskulatur auftrat (Kraupp *et al.*[2]) und 3. während der Durchströmung mit sulfathaltiger Tyrodelösung eine dauernde beträchtliche Steigerung der Empfindlichkeit der Muskulatur gegenüber intraarteriell verabreichtem Acetylcholin (Kontrakturwirkung) in Erscheinung trat (Stormann *et al.*[3]). An derselben Versuchsordnung rief Kalziumionenentzug allein die unter 1. angeführten Wirkungen nur in sehr geringem Ausmasse, die in 3. angegebenen nur vorübergehend und die unter 2. erwähnte Kontrakturwirkung überhaupt nicht hervor (Kraupp *et al.*[4]). Zum näheren Verständnis der Wirkung der Sulfationen auf die quergestreifte Muskulatur wurden in den nachstehend mitgeteilten Experimenten die bei Durchströmung mit Sulfationen ablaufenden elektrischen Veränderungen an den Membranen der Muskeln von hinteren Katzenextremitäten gleichzeitig mit den Kaliumverschiebungen untersucht.

Methodik. An isoliert durchströmten hinteren Extremitäten von Katzen (Kraupp *et al.*[4]) wurde das Membranpotential des Musculus gracilis *in situ* mit Glasmikroelektroden (gefüllt mit 3*m*-KCl, 2–10 $M\Omega$, Tippotential: unter 10 mV, Adrian[5]) intrazellulär registriert. Die Registrierung der Muskelspannung erfolgte am Musculus gastrocnemius mit Hilfe eines Dehnungsmeßstreifens und eines Sanborn Strain Gage Amplifiers sowie Direktschreibers (Kraupp *et al.*[4]). Die Kaliumkonzentration wurde flammenphotometrisch und die Chloridkonzentration in der Durchströmungsflüssigkeit nach der Methode von Schales und Schales[6] gemessen. Die Einstellung verschiedener Sulfatkonzentrationen erfolgte durch entsprechenden Ersatz des NaCl durch Na_2SO_4 1. in der Durchströmungsflüssigkeit und 2. in der den Musculus gracilis bedeckenden Flüssigkeit (flüssigkeitsdichte Hauttasche am Oberschenkel) in der Weise, dass die Natriumkonzentration unverändert blieb und je zwei Mol Cl durch ein Mol SO_4 ersetzt wurden. Die Osmolarität wurde durch Zusatz von Saccharose aufrecht erhalten.

Ergebnisse. In 228 Einzelmessungen betrug der Mittelwert des Ruhepotentials bei normaler Durchströmung: $-91{,}6 \pm 6{,}7$ mV (Standardabweichung). Nach Umschaltung auf chloridarme und sulfathaltige Durchströmungsflüssigkeiten trat gleichzeitig mit einem Ansteigen der venösen Kaliumkonzentration eine von der Höhe der Sulfatkonzentration bzw. Chloriderniedrigung abhängige Senkung des Ruhepotentials des Gracilismuskels in Erscheinung (Abb. 1). Die Sulfationenkonzentration betrug dabei in allen Versuchen den halben Wert der Chloridkonzentrationserniedrigung (siehe auch Methodik); alle anderen Ionenkonzentrationen wurden dabei konstant gehalten.

Die Messung des Ruhepotentials im Zeitpunkt der maximalen Depolarisation war schwierig durchzuführen, da die nach Einstich der Mikroelektroden gemessenen Potentialwerte zum Unterschied von dem Verhalten bei normaler Durchströmung nur kurze Zeit konstant blieben und immer wieder sprunghafte Änderungen auf etwas niedrigere oder höhere Potentialwerte zeigten.

[1] E. Frey, Arch. exper. Path. Pharmakol. *98*, 21 (1923).

[2] O. Kraupp, B. Pillat, H. Stormann und P. H. Clodi, Biochem. Z. *329*, 209 (1957).

[3] H. Stormann, O. Kraupp, B. Pillat und P. H. Clodi, Arch. exper. Path. Pharmakol. 1957 (im Druck).

[4] O. Kraupp, H. Stormann, B. Pillat und P. H. Clodi, Arch. exper. Path. Pharmakol. *229*, 419 (1956).

[5] R. H. Adrian, J. Physiol. *133*, 631 (1956).

[6] O. Schales und S. Schales, J. biol. Chem. *140*, 879 (1941).

Als Ursache dieser Instabilität des Membranpotentials konnten bei langsam ablaufender zeitlicher Registrierung des Membranpotentials am Oszillographen von Zeit zu Zeit spontan auftretende und mit einer Dämpfung ab-

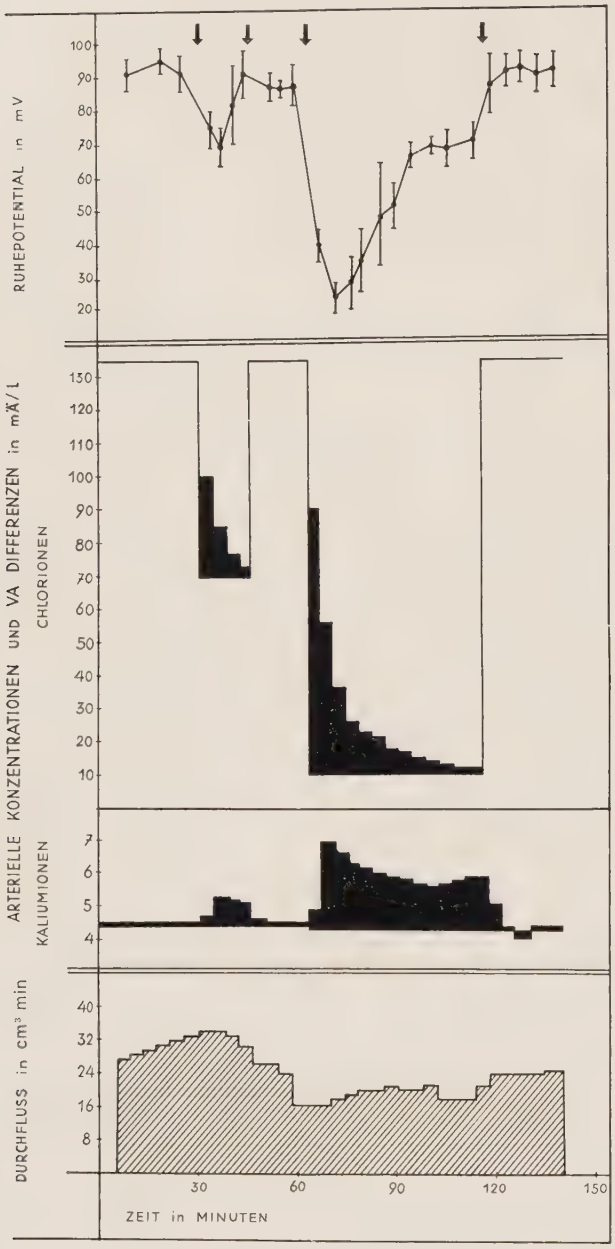


Abb. 1. Ruhepotential des *Musculus gracilis*, veno-arterielle Konzentrationsdifferenzen für Chlor- und Kaliumionen sowie Durchströmungsvolumen einer isoliert durchströmten hinteren Katzenextremität. Die Pfeile am oberen Rand der Abbildung zeigen die Zeitpunkte der Chloridkonzentrationsänderungen an. Die arterielle Sulfatkonzentration betrug zwischen 1. und 2. Pfeil: 32 *mM*/l und zwischen 3. und 4. Pfeil 62,5 *mM*/l. Die senkrechten Balken in Kurve *I* geben die Standarddeviation der einzelnen Meßserien. In Kurve *II* und *III*, äusserer Kurvenzug: arterielle bzw. Badkonzentrationen. Ausgefüllte Felder: VA Konzentrationsdifferenzen.

laufende Aktionspotentialsalven nachgewiesen werden, wobei gelegentlich auch eine Umkehr des Membranpotentials zu beobachten war (Abb. 2). Diese rhythmischen Entladungen dürften die Ursache für die von Adrian bei Sulfatinkubation (unter 10 *mM*/l Kalium) beobachteten mechanischen Fibrillationen sein.

Bei der Erklärung des Wirkungsmechanismus der Sulfationen auf die Muskelmembran ist die Analogie zu

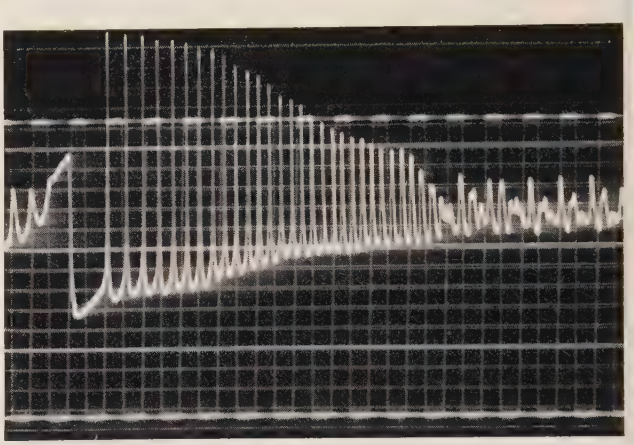


Abb. 2. Oszillationen des Membranpotentials des *Musculus gracilis* einer isolierten hinteren Katzenextremität bei Durchströmung mit 65 $mM/l\,SO_4''$, 15 $mM/l\,Cl'$, 10 $mM/l\,HCO_3'$, 149 $mM/l\,Na^+$, 4,2 $mM/l\,K^+$ und 1,8 $mM/l\,Ca^{++}$. Intrazelluläre Registrierung; Zeitkonstante des Verstärkers: 65 μs bei 5 $M\Omega$ Elektrodenwiderstand; Zeitmarkierung: 50/s; Ordinate: Obere strichlierte Linie: O mV, untere strichlierte Linie: −100 mV.

den Wirkungen des Veratrins (Depolarisation, Kaliumfreisetzung, Kontraktur und Instabilitätserscheinungen der depolarisierten Membran) (Straub[7], Kuffler[8], Ernst[9]) auffallend. Es ist daher naheliegend, auch bei der Sulfatwirkung eine Erhöhung der Natriumpermeabilität als eine der Ursachen für das Zustandekommen der beobachteten Erscheinungen anzunehmen. Zusätzlich kann jedoch eine durch Erniedrigung der extrazellulären Chloridkonzentration hervorgerufene Störung eines an der Muskelmembran bestehenden Donnangleichgewichtes nicht ausgeschlossen werden (Boyle und Conway[10], Kraupp *et al.*[2]). Die beobachteten Wirkungen des Sulfations weisen freilich auch starke Parallelen zur Wirkung des Kalziumentzugs auf (Brink[11]). Dies gilt vor allem für die Membraninstabilität und die damit verbundenen repetitiven schwingungsförmigen Aktionsstromabläufe. Ausmass und Verlauf der starken Membrandepolarisation, Auftreten der Kontraktur sowie die sprunghafte Erhöhung der Kaliumfreisetzung sprechen jedoch gegen einen ausschliesslich auf Herabsetzung der Kalziumionenkonzentration beruhenden Wirkungsmechanismus der Sulfationen, zumal unter den von uns verwendeten SO_4-Konzentrationen (rund $5 \cdot 10^{-2}$ *M*/l) keine besonders starke Herabsetzung der Kalziumkonzentration zu erwarten ist. (Oberer Grenzwert der extrazellulären Konzentration bei etwa 1,6 *mM*/l Ca bei Annahme eines Löslichkeitsproduktes von $8 \cdot 10^{-5}$ für $CaSO_4$ bei 36° C.)

G. Giebisch, O. Kraupp, B. Pillat und H. Stormann

Pharmakologisches Institut der Universität Wien, 3. Juni 1957.

[7] R. W. Straub, Helv. physiol. Acta *14*, 1 (1956).
[8] S. W. Kuffler, J. Neurophysiol. *9*, 367 (1946).
[9] E. Ernst, 10. Tagung der ungarischen physiologischen Gesellschaft, Rona *121*, 666 (1940).
[10] P. J. Boyle und E. J. Conway, J. Physiol. *100*, 1 (1941).
[11] F. Brink, Pharmacol. Rev. *6*, 243 (1954).

Summary

Electrical potential measurements of membrane resting and action potentials were made by means of electrolyte-filled glass micro-electrodes on single fibres of the musculus gracilis of the cat using a perfused hind-limb preparation *in situ*. The release of potassium from muscle and the tension developed by the gastrocnemius muscle were simultaneously recorded. The normal resting potential in our series was 91·7 mV (s.d. ± 6·7 mV). Partial replacement of the chloride by sulfate in the perfusion fluid led to (a) potassium release from the perfused hind-limb, (b) reversible contracture of the gastrocnemius muscle, (c) depression of the membrane resting potential which was proportional to the degree of replacement of chloride by sulfate in the perfusion fluid and (d) to the occurrence of volleys of spontaneous fibrillation potentials some of which had the shape of damped oscillations. These findings are similar to those observed after treatment with veratrine and are interpreted to be due to (1) increase in sodium permeability and (2) disturbance of the Donnan equilibrium for chloride ions.

Über die Wirkung blutzuckersenkender Sulfonylharnstoffe auf das isolierte Rattenzwerchfell

Der Wirkungsmechanismus der blutzuckersenkenden Sulfonylharnstoffe ist nicht geklärt. Besonders über die Wirkung dieser Substanzen auf den Kohlehydratstoffwechsel des Muskels bestehen relativ wenige Untersuchungen. Am isolierten Zwerchfell verursachen Sulfonylharnstoffe je nach den Autoren Verminderung[1] oder Vermehrung[2] der Glukoseaufnahme aus dem Inkubationsmedium; die Glykogenbildung ändert sich nicht[3]. Über Einfluss der Sulfonylharnstoffe auf O_2-Verbrauch und CO_2-Bildung durch das isolierte Zwerchfell wurde unseres Wissens bisher nicht berichtet.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung von Tolbutamid[4] und Carbutamid[4] auf das isolierte Rattenzwerchfell untersucht. Durch Vergleich dieser Substanzen mit Insulin sollten weitere Anhaltspunkte über den Wirkungsmechanismus der Sulfonylharnstoffe erhalten werden.

Methodik. Männliche Albinoratten von 60 bis 80 g wurden nach 24stündigem Fasten dekapitiert. Das exzidierte Zwerchfell wurde zweimal in eisgekühltem O_2-gesättigtem Phosphatpuffer (siehe unten) gewaschen, sagittal halbiert, zwischen Filtrierpapier getrocknet und gewogen. Zeitdauer zwischen Dekapitation und Waschung 1 min 10 s ± 10 s, Aufenthalt in den Waschflüssigkeiten durchschnittlich 3 min, Zeit für Trocknen und Wägen 10 s ± 3 s. Die Inkubation erfolgte in O_2-Atmosphäre bei 37,5°C in Phosphatpuffer[5] (ohne Kalzium, Glukosekonzentration 220 mg%), Schüttelfrequenz 150/min. In Doppelansätzen (Kontrolle und Versuch) wurden Zwerchfellhälften derselben Tiere verglichen. Tolbutamid und Carbutamid wurden in 0,05 ml 1*n* KOH, Insulin[6] in 0,05 ml 0,01*n* HCl gelöst und dem Inkubationsmedium zugesetzt. Korrektur des pH mittels HCl, bzw. NaOH.

Die Bestimmung des *Glukoseverbrauches* erfolgte aus der Glukosedifferenz[7] der Inkubationsflüssigkeit vor und nach 30minutiger Inkubation einer Zwerchfellhälfte in

[1] D. W. Clarke, M. Davidson, E. Schönbaum und H. Senman, Canad. med. Ass. J. *74*, 966 (1956).

[2] N. Canal, S. Garattini und L. Tessari, Clin. terap. *11*, 472 (1956).

[3] D. W. Clarke, M. Davidson, E. Schönbaum und H. Senman, Canad. med. Ass. J. *74*, 966 (1956). – J. B. Field und M. L. Woodson, Proc. Soc. exper. Biol. Med. N. Y. *93*, 534 (1956). – C. v. Holt, Verh. dtsch. Ges. inn. Med. *62*, 520 (1956).

[4] Tolbutamid = 1-*p*-Tolylsulfonyl-3,*n*-butylharnstoff; Carbutamid = 1-*p*-Sulfanilyl-3,*n*-butylharnstoff.

[5] H. A. Krebs und K. Henseleit, Hoppe-Seylers Z. *210*, 32 (1932).

[6] Kristallisiertes Insulin 'Novo'.

[7] H. C. Hagedorn und B. N. Jensen, Biochem. Z. *135*, 46 (1923); *137*, 92 (1923).

Tabelle I

Vergleich von Glukoseverbrauch, bzw. Glykogengehalt von Zwerchfellhälften gleicher Tiere mit und ohne Zusatz von Insulin, Tolbutamid oder Carbutamid.

Zwerchfellhälften wurden parallel mit und ohne Zusatz inkubiert. Die Absolutwerte der Ansätze mit Präparat wurden auf Absolutwerte der Ansätze ohne Präparat bezogen und die Änderung in Prozent angegeben. (Durchschnittlicher absoluter Glukoseverbrauch von Kontroll-Zwerchfellhälften: 5,63 mg/g Feuchtgewicht und Stunde. Glykogengehalt der Kontroll-Zwerchfellhälften durchschnittlich 267 mg/100 g Feuchtgewicht.)

Zusatz zum Inkubationsmedium	Veränderung des Glukoseverbrauches in %			Veränderung der Glykogenkonzentration in %		
	N	Mittelwert und *m**	*p***	*N*	Mittelwert und *m**	*p***
Schwankungsbreite der Methode (*K*)	10	− 6,2 ± 2,5		9	− 0,3 ± 2,4	
Insulin 1 E/ml	17	+86,9 ± 17,7	< 0,001	17	+22,1 ± 5,6	< 0,02; > 0,01
0,1 E/ml	12	+49,7 ± 9,9	< 0,001			
Tolbutamid $2 \cdot 10^{-3}$ mol/l	8	+66,3 ± 18,8	< 0,001	12	− 22,1 ± 4,6	< 0,001
$2 \cdot 10^{-4}$ mol/l	11	+31,5 ± 11,4	< 0,01; > 0,001			
$2 \cdot 10^{-5}$ mol/l	7	+20,5 ± 12,6	< 0,03; > 0,02			
Carbutamid $2 \cdot 10^{-3}$ mol/l	9	+46,2 ± 12,6	< 0,001			
$2 \cdot 10^{-4}$ mol/l	16	+27,9 ± 7,9	< 0,01; > 0,001			

* Mittlerer Fehler $m = \pm \sqrt{\frac{\Sigma d^2}{N\ (N-1)}}$.

** Bezogen auf Kontrollserie für Schwankungsbreite (*K*).

Tabelle II

Vergleich von O_2-Verbrauch und $C^{14}O_2$-Abgabe aus vollständig C^{14}-markierter Glukose durch Zwerchfellhälften gleicher Tiere mit und ohne Zusatz von Insulin oder Tolbutamid.

Zwerchfellhälften wurden parallel mit und ohne Zusatz inkubiert, die Ansätze mit Präparaten auf solche ohne Präparat bezogen und die Änderung in Prozent ausgedrückt. (Absolute Durchschnittswerte: Q_{O_2} = 8,97; relative spezifische Aktivität 1965 Impulse/min/mg CO_2 C; relative totale Aktivität = 15,9 Impulse/min/mg Trockengewicht und Stunde; Oxydation von vollständig markierter C^{14}-Glukose zu $C^{14}O_2$: etwa 10% der aus dem Inkubationsmedium verbrauchten Glukose.)

Zusatz zum Inkubationsmedium	N	Veränderung des O_2-Verbrauches in %		Veränderung der $C^{14}O_2$-Abgabe in %			
				totale Aktivität		spezifische Aktivität	
		Mittelwert u. m*	p**	Mittelwert u. m*	p**	Mittelwert u. m*	p**
Schwankungsbreite der Methode (K) .	6	− 3,6 ± 2,1		+ 0,3 ± 9,6		+ 4,3 ± 4,7	
Insulin 1 E/ml . .	10	+ 7,1 ± 5,7	< 0,2; > 0,1	+ 9,2 ± 6,9	> 0,5	+ 3,8 ± 12,8	> 0,8
Tolbutamid $2 \cdot 10^{-3}$ mol/l. . .	10	±22,9 ± 7,5	< 0,05; > 0,02	+175,8 ± 29,5	< 0,001	+108,0 ± 18,7	< 0,01; > 0,001

* Mittlerer Fehler $m = \pm \sqrt{\frac{\Sigma d^2}{N(N-1)}}$. ** Bezogen auf Kontrollserie für Schwankungsbreite (K).

0,5 ml Puffer. Berechnung in mg Glukose/h/g Feuchtgewicht.

Glykogen. Je 2 Zwerchfellhälften wurden in je 2 ml Puffer während 30 min inkubiert und zur Mikrobestimmung von Glykogen[8] rasch in 30% KOH von 100°C verbracht. Berechnung in mg/100 g Feuchtgewicht.

O_2-Aufnahme und $C^{14}O_2$-Bildung. Je 2 Zwerchfellhälften wurden in Warburggefässen in je 2 ml Puffer mit 2 μC vollständig markierter C^{14}-Glukose[9] während 60 min inkubiert. Dann erfolgte Einkippen von 0,3 ml 5n H_2SO_4 und Absorption des $C^{14}O_2$ in 0,2 ml 30% KOH (im Zentralgefäss)[10], anschliessend in einer evakuierten Mikroabsorptionsapparatur Wiederfreisetzung des absorbierten $C^{14}O_2$ mittels H_2SO_4 nach Zugabe von inaktivem $NaHCO_3$ (5 ml 596 mg%ige Lösung) sowie erneute Absorption des CO_2 in $Ba(OH)_2$. Überschüssiges $Ba(OH)_2$ wurde zurücktitriert[11] und das $BaCO_3$ als Plättchen unendlicher Schichtdicke in einem Tracerlab-precipitation-Apparat abgenutscht. Die Aktivitätsmessung der mit Methanol gewaschenen und mit Infrarot getrockneten Plättchen erfolgte in einem Tracerlab-windowless-flow-counter bis zu einem Total von 10000 Impulsen. Nach Korrektur für den Nulleffekt wurde die relative totale Aktivität auf 1 mg Gewebstrockengewicht bezogen und die relative spezifische Aktivität als Impulse/mg C des Atmungs-CO_2 ausgedrückt. $-Q_{O_2}$ = μl O_2/mg Trockengewicht und Stunde. Trocknung der Zwerchfelle bei 100°C während 15 h.

Resultate und Diskussion

1. Der Glukosegehalt im Inkubationsmedium nahm nach Zusatz von $2 \cdot 10^{-4}$ und $2 \cdot 10^{-3}$ mol/l Tolbutamid und Carbutamid 28–66% stärker ab als in Kontrollansätzen. Der Unterschied ist signifikant ($p < 0{,}01$). Sulfonylharnstoffe bewirken somit gleich wie Insulin[12] eine Vermehrung des Glukoseverbrauches. Damit wird ein früherer Befund[2] bestätigt.

2. Der Glykogengehalt des Zwerchfells war nach Inkubation mit $2 \cdot 10^{-3}$ mol/l Tolbutamid niedriger (um 22%) als ohne Tolbutamidzusatz ($p < 0{,}01$). Insulin hingegen bewirkte die zu erwartende[13] Zunahme des Muskelglykogens.

3. Zusatz von $2 \cdot 10^{-3}$ mol/l Tolbutamid führte sowohl zu Erhöhung des O_2-Verbrauches (+ 22%, $p < 0{,}02$) als auch der $C^{14}O_2$-Abgabe aus vollständig markierter C^{14}-Glukose (relative spezifische Aktivität + 108%; relative totale Aktivität + 176%, $p < 0{,}01$). Die CO_2-Abgabe war also mehr gesteigert als der O_2-Verbrauch. Dieser Effekt steht im Gegensatz zu dem des Insulins, das wie in früheren *in vitro*-Untersuchungen[13] nicht zu Steigerung von O_2-Verbrauch und $C^{14}O_2$-Abgabe aus C^{14}-Glukose führte.

Aus diesen Befunden darf geschlossen werden, dass der Wirkungsmechanismus der Sulfonylharnstoffe auf den Kohlehydratstoffwechsel des isolierten Rattenzwerchfells in Steigerung der Glukose-Oxydation besteht. Die Wirkung von endogenem, möglicherweise am Zwerchfell haftendem Insulin wird wahrscheinlich nicht gesteigert, da die beobachteten Wirkungsqualitäten von Insulin und Sulfonylharnstoffen verschieden sind. Auch mit Insulin/Sulfonylharnstoff-Kombinationen konnte keine Zunahme der Insulin-Wirkung (gemessen an der Glykogen-Bildung) am Rattenzwerchfell erreicht werden[14]. Unsere Befunde sagen nichts darüber aus, ob Gegenwart von geringen am Muskel haftenden Insulinmengen eine Bedingung für die Steigerung der Glukose-Oxydation durch Sulfonylharnstoffe ist.

Vermehrung der Glukose-Oxydation am isolierten Rattenzwerchfell beruht also wahrscheinlich auf einem Mechanismus, der von den zur Zeit postulierten Wirkungsmechanismen der Sulfonylharnstoffe (Hemmung von Glukoseabgabe durch die Leber und von Insulinase, Steigerung von Insulin-Empfindlichkeit und -Sekretion) verschieden ist.

[8] O. Walaas und E. Walaas, J. biol. Chem. *187*, 769 (1950).

[9] Radiochemical Centre, Amersham, England.

[10] S. S. Chernick, E. J. Masaro und I. L. Chaikoff, Proc. Soc. exper. Biol. Med. N. Y. *73*, 348 (1950).

[11] R. C. Anderson, Y. Delabarre und A. A. Bothner-By, Analyt. Chem. *24*, 1299 (1952).

[12] W. C. Stadie, Physiol. Rev. *34*, 52 (1954).

[13] W. C. Stadie, Physiol. Rev. *34*, 52 (1954). – A. Beloff-Chain, R. Catanzaro, E. B. Chain, I. Masi, F. Pocchiari und C. Rossi, Proc. roy. Soc. [B] *143*, 481 (1955).

[14] J. B. Field und M. L. Woodson, Proc. Soc. exper. Biol. Med. N. Y. *93*, 534 (1956). – W. C. Stadie, Physiol. Rev. *34*, 52 (1954). A. Beloff-Chain, R. Catanzaro, E. B. Chain, I. Masi, F. Pocchiari und C. Rossi, Proc. roy. Soc. [B] *143*, 481 (1955).

Am eviszerierten (und damit pankreatektomierten) Tier[15] bewirken Sulfonylharnstoffe im Gegensatz zu unseren Versuchen keine Steigerung der Glukose-Oxydation. Möglicherweise fehlen hier Faktoren, welche für die Sulfonylharnstoffwirkung auf den Muskel nötig und am Zwerchfell von Normaltieren vorhanden sind. Untersuchungen, ob die Gegenwart von Insulin oder andere Faktoren Voraussetzung für die gefundene Wirkung der Sulfonylharnstoffe am isolierten Rattenzwerchfell ist, sind im Gange.

A. Pletscher und K. F. Gey

Medizinische Forschungsabteilung der F. Hoffmann-La Roche & Co. AG., Basel, 18. Juni 1957.

Summary

The action of blood sugar depressing sulfonylureas on glucose and oxygen uptake, as well as on glycogen content and formation of $C^{14}O_2$ from uniformly labelled C^{14}-glucose was investigated in rat hemidiaphragms incubated in phosphate buffer. The following results were obtained: (1) Tolbutamide and Carbutamide increased the glucose uptake. (2) Tolbutamide decreased the glycogen-content. (3) Oxygen uptake as well as formation of $C^{14}O_2$ were increased by Tolbutamide. (4) The action of Tolbutamide and insuline was equal with respect to glucose uptake but different as regarding the glycogen content, oxygen uptake and CO_2-formation.

It is concluded that sulfonylureas increase glucose oxidation in the rat hemidiaphragm probably without increasing insulin sensitivity. To our knowledge this mechanism of action has hitherto not been described.

[15] A. Wick, B. Britton und R. Grabowski, Metabolism *5*, 739 (1956).

Photolyse ultraviolette et photoréactivation des bactéries – aspects de dépolymérisation et repolymérisation des acides nucléiques bactériens

Causes physicochimiques du défaut de photoréactivation différée

L'irradiation ultraviolette réalisée notamment par des longueurs d'onde de 2537 Å correspondant à la bande d'absorption des acides nucléiques, provoque l'inhibition de la croissance des bactéries. Cette inhibition est susceptible d'être annulée par photoréactivation due à l'irradiation des mêmes bacilles par des rayons du spectre visible à longueur d'onde comprise entre 3600 et 4900 Å[1].

Le processus d'inhibition de la croissance bactérienne sous l'action des rayons UV. s'accompagne d'une diminution de la teneur[2] en acide désoxyribonucléique par mg de bactérie, tandis qu'il y a augmentation de la teneur en fraction acidosoluble, c'est-à-dire des constituants de nature purique, pyrimidique, du P organique acidosoluble, de ribose et désoxyribose[3]. Cette réduction de la teneur en acide nucléique a été interprétée comme correspondant à l'inhibition de la synthèse des acides nucléiques dans les microorganismes irradiés[2]. L'accumulation des constituants de poids moléculaire peu élevé dans la substance des bactéries irradiées a, pour sa part, été interprétée comme l'expression d'un arrêt d'intégration des précurseurs dans la structure de la macromolécule de l'acide désoxyribonucléique[3].

La photoréactivation par action sur les bactéries soumises à l'effet des radiations UV., de la lumière visible va de pair avec le retour à la teneur initiale en acide désoxyribonucléique, ce qui a été interprété comme un retour à la synthèse de l'acide désoxyribonucléique[2]. La photorestauration après irradiation par UV. des microorganismes peut être complète si elle est tentée immédiatement après les UV. Cependant les microorganismes perdent complètement l'aptitude à la photoréactivation lorsqu'ils sont conservés à l'abri de la lumière pendant une durée de 2 à 3 h[4]. Ce phénomène n'a pas trouvé d'explication et nous avons abordé son étude.

Les phénomènes étudiés semble-t-il peuvent être expliqués d'une façon différente. On peut en effet supposer que la dissipation de l'énergie radiante UV. acquise peut conduire à une dépolymérisation des acides nucléiques[5] et à une accumulation des fragments issus de cette structure. La photoréactivation résultant de l'action des rayons à longueur d'onde supérieure et à énergie par quantum moindre, pourrait causer la repolymérisation de ces fragments et par conséquent le retour à la teneur initiale en acide désoxyribonucléique bactérien. En effet, dans ces molécules complexes, les constituants des liaisons chimiques rompues par suite de l'irradiation peuvent, du fait de leur poids moléculaire encore considérable, être maintenus suffisamment rapprochés pour rendre possible des recombinaisons[6] sous l'influence d'un apport énergétique modéré venant par exemple de la photoréactivation. Nous avons été amenés à supposer que le défaut de la photoréactivation, après un certain temps de séjour des bactéries irradiées dans le milieu de culture ou milieu tampon à l'abri de la lumière, pourrait être imputable au départ des fragments de l'acide nucléique de la substance bactérienne, et à leur diffusion vers la phase aqueuse du milieu ambiant. En ce cas, le retour au taux initial de l'acide désoxyribonucléique n'aurait plus été possible.

La dépolymérisation de l'acide désoxyribonucléique de la substance bactérienne doit conduire à une accumulation des fragments à poids moléculaire peu élevé, porteurs des groupements fonctionnels. Ainsi la densité des groupements fonctionnels et par conséquent de la charge par unité de surface de la substance bactérienne doit augmenter aussi longtemps que les fragments provenant de la dépolymérisation des acides désoxyribonucléiques bactériens sont présents dans la substance du microorganisme irradié par les UV. Si, après un certain temps de séjour des bactéries irradiées par les UV. dans le milieu de culture ou milieu tampon à l'abri de la lumière, une diffusion de ces fragments, comme nous l'avons supposé, a lieu – la densité de charge par unité de surface devrait nécessairement se trouver réduite. On devrait en ce cas pouvoir retrouver dans le

[1] A. Kelner, Proc. nat. Acad. Sci. *35*, 73 (1949). – A. Kelner, W. D. Bellamy, G. E. Stapleton et M. R. Zelle, Bact. *19*, 22 (1955). – A. Kelner, J. Bacteriol. *58*, 511 (1949); J. gen. Physiol. *34*, 835 (1951).

[2] A. Kelner, J. Bact. *65*, 252 (1953).

[3] D. Knazir et M. Errera, Biochim. biophys. Acta *14*, 62 (1954).

[4] A. Kelner, Bull. N. Y. Acad. Med. *26*, 189 (1950).

[5] A. Hollaender, J. P. Greenstein et W. V. Jenrette, J. nat. Cancer Inst. *2*, 23 (1941).

[6] Mc. D. Laren, Advanc. Enzymol. *9*, 76 (1949).

milieu ambiant ces fragments de l'acide désoxyribonucléique grâce à leur spectre caractéristique dans l'ultraviolet et cela à des concentrations supérieures à celles retrouvées dans le milieu dans lequel ont séjourné les bactéries, milieu analysé immédiatement après l'irradiation.

Nous avons eu recours à des mesures de mobilité électrophorétique des bactéries en vue de déterminer la charge par unité de surface de celles-ci[7]. Des mesures ont été effectuées soit immédiatement après l'irradiation soit après 24 h de conservation des bactéries irradiées à l'abri de la lumière. D'autre part les milieux dans lesquels ont séjourné les bactéries ont été soumis à l'analyse spectrophotométrique tendant à déceler la présence des fragments provenant de la structure de l'acide désoxyribonucléique. Ces mesures ont été effectuées sur les milieux provenant des suspensions bactériennes immédiatement après l'irradiation par UV. et également après 24 h de séjour des bactéries irradiées à l'abri de la lumière.

Technique expérimentale: Les mesures ont été effectuées sur des bacilles *Escherichia coli* cultivés sur agar puis dans l'eau peptonée à 1% durant 24 h à 37°. Les bactéries ont été décantées par centrifugation puis lavées et décantées par centrifugation trois fois dans le milieu tampon acétique ($\mu = 0{,}01$; pH = 5,5). Des fractions de 20 ml de la suspension bactérienne à $4 \cdot 10^9$ cellules/ml ont été irradiées par des doses variables de rayons UV. d'une lampe germicide G.E. Chaque fraction de la suspension bactérienne ainsi irradiée a été partagée en deux portions à 10 ml chacune dont l'une est analysée immédiatement, l'autre après 24 h de séjour à l'abri de la lumière. Ces suspensions bactériennes sont chaque fois filtrées sur un filtre de Seitz; le filtrat est soumis à l'analyse spectrophotométrique entre 2300–2700 Å, tandis que les bactéries sont soumises à des mesures de mobilité électrophotométrique dans le milieu tampon acétique ($\mu = 0{,}01$; pH = 5,5). La densité de charge par unité de surface σ pour ce milieu à ions monovalents est évaluée d'après

$$\sigma = 2\sqrt{\frac{NDkT}{2000}}\mu \sin h \frac{\zeta \varepsilon}{2kT}\,^{7}.$$

Les courbes de la densité de charge par unité de surface en fonction de l'énergie radiante UV. mise en jeu, déterminées immédiatement après l'irradiation et également après 24 h de conservation à l'abri de la lumière montrent:

a) Une augmentation de la charge par unité de surface de la substance des bactéries immédiatement après leur irradiation par rayons UV., par action des faibles énergies mises en jeu; aux énergies UV. supérieures absorbées il y a compétition entre l'effet des radiations UV. déterminant des dissociations éléctrolytiques et conduisant à un accroissement de la densité de la charge par unité de surface (ouverture des liaisons peptides etc.) d'une part, et l'effet conduisant au cisaillement des groupements fonctionnels et réduisant par conséquent la densité de charge par unité de surface (par désamination, décarboxylation etc.) d'autre part[8].

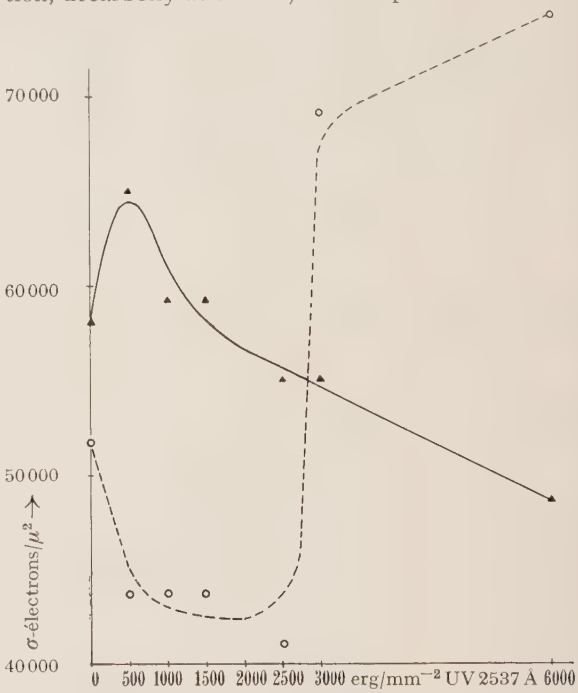


Fig. 1. Etude électrophorétique des bactéries (*Escherichia coli*) irradiées par des rayons UV. à 2537 Å, en fonction de l'énergie radiante mise en jeu (abscisse), sur l'axe des ordonnées 0 densité de charge par unité de surface (erreur moyenne 1%).
——— bactéries examinées immédiatement après l'irradiation.
– – – bactéries irradiées examinées passé 24 h de séjour à l'abri de la lumière.

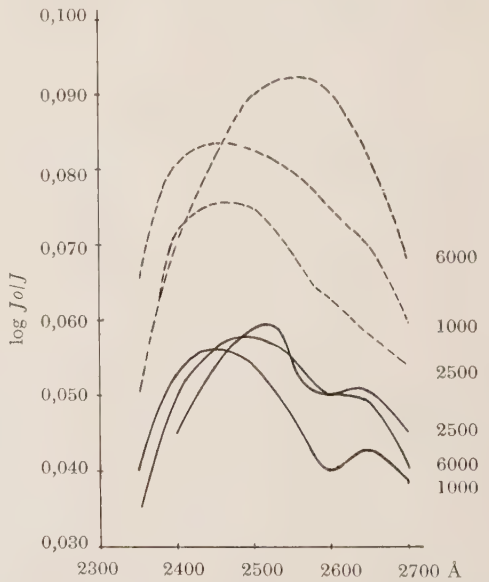


Fig. 2. Etude spectrophotométrique des liquides dans lesquels ont séjourné des bactéries (*Escherichia coli*) irradiées par doses différentes (1000, 2500, 6000 erg./mm²) des rayons UV. à 2537 Å.
——— liquides examinés immédiatement après l'irradiation.
– – – liquides dans lesquels les bactéries irradiées par des rayons UV. ont séjourné 24 h étant à l'abri de la lumière.

[7] H. A. Abramson, L. S. Moyer et M. H. Gorin, *Electrophoresis of Proteins* (Reinhold publ. N.Y. 1942). – L. S. Moyer, J. Bacteriol. *31*, 531 (1936); *32*, 433 (1936).

[8] M. W. Lisse et R. P. Tittsler, Proc. Soc. exper. Biol. Med. N. Y. *28*, 811 (1931), ont observé une mobilité électrophorétique accrue des bactéries irradiées par la lumière UV. immédiatement après l'irradiation, suivie d'une chute de la mobilité électrophorétique précédant l'effet léthal.

b) Une diminution nette de la charge par unité de surface des mêmes bactéries irradiées, mais conservées dans leur milieu à l'abri de la lumière durant 24 h.

L'analyse spectrophotométrique des milieux tampons acétiques dans lesquels les bactéries, *Escherichia coli*, ont été soumises à l'action des rayons ultra-violets montre:

a) Un même niveau de substances absorbant la lumière dans la région du spectre correspondant à l'absorption des acides nucléiques, pour les liquides provenant des bacilles immédiatement après l'irradiation.

b) un enrichissement de ces milieux tampons en substances absorbant la lumière dans la région du spectre correspondant à l'absorption des acides nucléiques, des liquides dans lesquels les bacilles irradiés par les rayons UV. ont séjourné 24 h à l'abri de la lumière (Courbe 2).

L'analyse électrophorétique de la substance bactérienne met en relief le départ, après un certain temps de séjour à l'abri de la lumière, des substances qui étaient responsables de l'accroissement de la densité de charge par unité de surface dans les premiers moments qui suivent l'irradiation par rayons UV. L'analyse spectrophotométrique des liquides ayant contenus ces bacilles prouve en même temps la diffusion de ces substances de la cellule bactérienne vers la phase aqueuse et révèle leur nature. La photoréactivation possible dans les premiers moments qui suivent l'irradiation UV. des bacilles du fait de la présence dans la substance bactérienne des fragments de dépolymérisation de la macromolécule de l'acide nucléique, est rendu impossible lors du départ (diffusion) de ces fragments vers la phase aqueuse. Ces observations semblent indiquer que le phénomène de la photoréactivation serait lié à la répolymérisation de la macromolécule de l'acide désoxyribonucléique primitivement scindée.

I. Grundland,
H. Krzywicka et
M. Chojnacki

Institut de Biochimie et Biophysique P.A.N., Université de Varsovie, le 24 avril 1957.

Summary

Electrophoretic analysis of bacterial substance proves the departure, from UV irradiated microbes screened from light for a certain time, of substances which were responsible for increasing the charge density by surface unit during the first moments which follow the irradiation by UV rays. Spectrophotometric analysis of liquids having contained these bacilli proves concommitantly the diffusion of those substances from the bacterial substance to the aqueous phase and reveals their nature. The photoreactivity which is possible during the first moments following the UV irradiation of bacilli, due to the presence of the fragments of depolymerisation of nucleic acid macromolecule in the bacterial substance, becomes impossible after the departure (diffusion) of those fragments to the aqueous phase. These observations seem to show that the phenomenon of photoreactivity is connected with the repolymerisation of the macromolecule primitively divided of desoxyribonucleic acid.

Pro Memoria Carl Neuberg

Editorial Note. The Nestor of biochemistry, 14 days before his death, had worked out the following lecture experiments on the chemismus of certain fundamental biochemical processes of intermediary metabolism. We publish this original idea, which is of general and didactic interest, in memory of the great research worker and teacher, Carl Neuberg.

Lecture-Demonstration

by

Carl Neuberg*

Experimental Demonstration of some fundamental biochemical reactions**.

(1) Phosphorylation;
(2) Enzymatic dephosphorylation; simultaneous formation of insoluble bone salts;
(3) New form of trapping method for fixation of metabolic intermediates;
(4) Solubilization of the inorganic portion of bones and teeth in a neutral medium;
(5) Hydrotropic solubilization of insoluble matter;
(6) Instantaneous formation of free mineral acid by interaction of two neutral substances;
(7) Instantaneous occurrence of the carbamate reaction.

Ladies and Gentlemen,

You all know well the facts about which I will speak to you, but not all of you may have seen the corroborating experiments.

(1) Phosphorylation was discovered in 1905 by the famous Russian plant physiologist Leonid Iwanoff and described by him in French and German journals[1]. Iwanoff already showed that in many cases especially the biosynthetically famed phosphoorganic compounds consist of phosphoric acid esters of carbohydrates. Further work on this problem was done by Harden[2]. Iwanoff never received due credit for his important discovery since he did the worst thing that a researcher can do in such a situation: he died.

I want to show you the fundamental principle of the discovery in an extremely simple experiment as we can demonstrate it to-day based on the experience of 5 decades.

We start with a 20% solution of glucose, fructose or sucrose. To 100 ml of this sugar solution we add a freshly prepared, therefore well buffered solution of 4·2 g sodium dihydrogen phosphate dihydrate and 1·1 g of sodium bicarbonate in 25 ml water. The resulting 125 ml of liquid are shaken at 37° with 10 g of one of the dried yeasts now commercially available plus 20 ml carbon-

* Two weeks before he died Prof. Neuberg gave this lecture-demonstration at the New York Medical College. He spoke the introductory and the closing remarks, his daughter I. S. Forrest read the lecture, his co-worker A. L. Grauer carried out the experiments which she had adapted for lecture demonstration. After the lecture, tributes to Dr. Neuberg were made by Dr. F. F. Nord of Fordham University and Dr. Severo Ochoa of New York University.

** Supported by a contract of the US Atomic Energy Commission with the New York Medical College.

[1] I. Iwanoff, Trav. Soc. Nat. St.-Pétersb. (Léningr.) *34* (1905); Ber. dtsch. bot. Ges. *20*, 366 (1902); Z. physiol. Chem. *39*, 31 (1903); *42*, 464 (1904).

[2] A. Harden, *Alcoholic fermentation* (Longmans, Green & Co., London-New York 1932).

tetrachloride to effect plasmolysis. After 20 min the clear filtrate no longer reacts with magnesia mixture, showing the absence of inorganic phosphate, while the control sample to which the phosphorylating agent, dried yeast, has not been added still gives a strong Mg-reaction for inorganic phosphate.

(2) In 1911, there worked in my laboratory in Dahlem, Kemal Djenab[3], the brother of Ata Turk, the first president of Turkey. Together we published that the enzyme phosphatase which is present in all cells, in particular in microorganisms, precipitates insoluble inorganic calcium phosphate from solutions of Ca-salts of sugar phosphates.

Many authors soon confirmed this finding. It formed the basis of a theory of calcification of cartilage and bone formulated a few years later by Robison[4], and also for the application of this reaction to the histological determination of phosphatase recommended in 1938 by Takamatsu[5] and in 1939 by Gomori[6]. Without discussing the question of the existence of various phosphatases with different pH optima in the acid, neutral or alkaline range and different types of phosphorylation, I wish to show you the basic experiment with an enzyme preparation from *Aspergillus oryzae*, the so-called Taka-phosphatase. This preparation has various applications in industry and medicine. It contains phosphatases, active at various pH values. As substrate we use calcium glycerophosphate, which is also commercially available. A suitable solution is prepared by dissolving 4·8 g calcium glycerophosphate and 3 g ammonium chloride in 100 ml water. On shaking with 3 g of the enzyme at room temperature, most of the enzyme goes into solution. At 40°, solid calcium phosphate separates from the clear filtrates in a few minutes. At room temperature, the same phenomenon can be observed after somewhat longer standing[7].

While we run this experiment, I shall show you the effect in tests which we set up a few hours ago.

Instead of calcium glycerophosphate, soluble calcium salts of many other organic phosphoric acid esters can be used. Calcium can be replaced by any cation which forms insoluble inorganic phosphates. I show you here the precipitation of ferric phosphate as the result of an analogous experiment set up this morning with pharmaceutically important ferric glycerophosphate.

(3) For all branches of experimental biology, knowledge of intermediary metabolism is of utmost importance. To establish the various steps involved, it is usually necessary to deduce the function of added compounds by the fact that they produce the same metabolic end products as would be expected under normal conditions. A procedure by which insight into metabolism is gained by trapping presumptive intermediary products with suitable reagents, was first applied in 1918 and has since been utilized in many cases[8]. These so-called trapping methods were especially valuable in the elucidation of intermediates in glycolytic processes. As a demonstration I have selected the classical example of the trapping of acetaldehyde which occurs as an intermediary product in alcoholic fermentation of sugar.

200 ml of a 5% sugar solution are fermented with 15 g dried yeast or the equivalent amount of fresh yeast. Another sample is treated in the same way but a neutral sulfite is added as trapping agent. As soon as fermentation starts an aliquot is withdrawn from both tests and a few drops of a sodium nitroprusside solution plus a few ml of a 5% diethylamine solution added. Without filtering or distilling, it can be seen that the sample containing sulfite becomes deep blue while the control solution remains colourless. To allow us to carry out the experiment in this simple manner, we use calcium sulfite as trapping agent. It is more stable than the sodium salt and no adjustment of pH is needed in this case. Diethylamine, like any secondary aliphatic amine, decomposes the aldehyde disulfite compound. The sugar is split according to the equation:

$$C_6H_{12}O_6 \rightarrow CH_3 \cdot CHO + CO_2 + CH_2\,OH \cdot CHOH \cdot CH_2OH$$

and in the presence of sulfite the intermediary acetaldehyde is accumulated:

$$C_6H_{12}O_6 + Na_2SO_3 + H_2O \rightarrow CH_3 \cdot CHOH \cdot SO_3Na + NaHCO_3 + CH_2OH \cdot CHOH \cdot CH_2OH.$$

Incidentally this is the process by which, during the first World War, glycerol was produced biosynthetically in considerable amounts in industry.

(4) Next I want to show you the solubilization of insoluble substances in aqueous solutions at neutral or weakly alkaline pH[9]. I make a fresh precipitate of inorganic calcium phosphate and you will see that it dissolves in a 5% solution of sodium nucleate while it obviously remains insoluble in water. In an article in the *Advances in Enzymology*, I have described 9 different mechanisms by which various naturally occurring substances can be brought into solution at neutral or weakly alkaline pH[10]. The theoretical basis for these solubilization phenomena is not quite simple. In general terms, it is a question of formation of molecular complexes of higher order but not necessarily always chelates.

To 30 ml of a 0·1 *M* solution of $CaCl_2$, I add 20 ml 0·1 *M* disodiumhydrogen phosphate. To one half of the resulting suspension of tricalcium phosphate, I add 75 ml water and to the other half 75 ml of 5% sodium nucleate solution. The sample which contains the nucleate becomes perfectly clear. Salts of ATP and other nucleotides show the same behaviour. The number of possible 'solvents' which effect the solubilization of such precipitates is enormous.

(5) Although hydrotropy may be considered as one special phenomenon of the general problem of solubilization of insoluble matter in nature, I still want to explain the reaction by showing you an example. When aqueous solutions of alkali salts of many aliphatic, aromatic and hydroaromatic acids are added to water, insoluble substances are brought into the aqueous phase. This group of solubilizing agents includes the nitrogen free acids formed on putrefaction of amino acids. Synthetic compounds in which the carboxylic acid group has been replaced by a sulfonic acid group show the same effect.

[3] K. Djenab and C. Neuberg, Biochem. Z. *82*, 391 (1917).

[4] R. Robison, *Significance of phosphoric esters in metabolism* (The New York University Press, 1932).

[5] H. Takamatsu, J. orient. Med. *31*, 34 (1938); Trans. Soc. path. Japan *29*, 492 (1939).

[6] G. Gomori, Proc. Soc. exp. Biol. Med. N. Y. *42*, 23 (1939).

[7] I. S. Forrest, A. Grauer, M. Kreidl, and C. Neuberg, Enzymologia *17*, 97 (1954).

[8] C. Neuberg and E. Reinfurth, Biochem. Z. *89*, 365 (1918). – C. Neuberg and J. Hirsch, Biochem. Z. *98*, 141 (1919). – C. Neuberg, Amer. Brewer *75*, 22 (1942).

[9] C. Neuberg and I. Roberts, Arch. Biochem. *20*, 185 (1949). – I. Mandl, A. Grauer, and C. Neuberg, Biochim. biophys. Acta *8*, 654 (1952) and *10*, 540 (1953).

[10] I. Mandl and C. Neuberg, Advanc. Enzymol. *17*, 135 (1956).

This property described in detail in 1916[11] led to the development of modern detergents when the technical production of higher aliphatic alcohols was perfected in the United States.

For the demonstration I chose instead of Na-benzoate, which is a common product of metabolism, the related sodium salt of the medically important ortho-hydroxybenzoic acid, sodium salicylate. To 10 ml isoamyl alcohol, I add 10 ml of a 25% sodium salicylate solution. As you see, a clear solution is obtained immediately. The same is true when aniline and sodium salicylate are mixed. If I now add water to these clear solutions, separation into the components takes place.

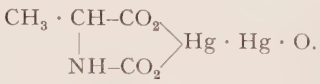
(6) Back in 1825, Wöhler[12] made a fundamental discovery. He showed that in living organisms the neutral alkali salts of hydroxy acids ingested with vegetable intake are converted into alkali carbonates. Interpreted on the basis of modern concepts, this would mean that successively liberated CO_2, first emerging in the form of alkalibicarbonate, is converted into carbonate by enzymatic action of carbonic anhydrase. Through this conversion of salts of hydroxy acids, such as lactic, citric, tartaric, malic acids etc. into alkalicarbonates, the organism has a means of regulating the pH in the cells. On the other hand, hardly any reactions in which neutral substances are converted into acidic ones have been known. Recently we described a large number of mechanisms for the simple formation of strong mineral acids on mixing two neutral substances. This can be demonstrated for all thiol compounds, dicarbonyl compounds, salts of keto acids etc.[13].

Mercapto compounds, such as cysteine or glutathione in the form of their neutral salts, when mixed with cupric chloride at almost neutral pH immediately produce free HCl. Without presuming that this might explain the mechanism of HCl production in the stomach, we believe that this reaction provides the cell with a universal means of procuring H-ions instantaneously.

In the experiment that I shall show you, sodium ascorbate is mixed with $CuCl_2$. Free HCl and cuprous chloride form according to the equation: $2\ CuCl_2 + H_2$ $2\ CuCl + 2\ HCl$. Cuprous chloride as such is insoluble in water. If sodium chloride is added a water-soluble $NaCl \cdot CuCl$ complex forms and the mixture remains clear. The reaction mixture contains free HCl which can be determined electrometrically or simply with congo paper.

A mixture of 20 ml 0·1 *M* Na-ascorbate, 10 ml saturated sodium chloride solution and 40 ml 0·1 *M* cupric chloride solution immediately changes congo paper to a deep blue. It is well known that cupric ions are cell constituents of biological significance. Actually the salt of any metal with various states of oxidation can be used. Since in air the cuprous salt becomes reoxidized this reaction represents a continuous system. By the same principal all acids of physiological significance, hydrochloric, sulfuric, nitric, phosphoric, thiocyanic, may become available to the cell by this instantaneous reaction.

(7) Erlenmeyer[14] in 1875 made an observation the importance of which was not recognized by his contemporaries or later workers in this field. Erlenmeyer found that alkalicarbonate can add on to the α-amino group of synthetic α-amino caprylic acid forming the salt of a carbamino carboxylic acid. Later workers prepared alkaline earth salts of N-carboxy amino acids by bubbling CO_2 for hours or days into mixtures of amino acids and alkaline earth hydroxides at pH 13·5 with thorough ice cooling. For analytical purposes, Neuberg and Ishida[15] had published in 1911 that instantaneous precipitation of α-amino acids at room temperature can be accomplished with a mixture of mercuric acetate and sodium carbonate. The reaction results in the formation of a basic mercuric carbamate, which, in the case of alanine, may be formulated



With the aid of this reaction, we can show the instantaneous precipitation of carbamates which are present in urine and blood. The reaction takes place at neutral pH under physiological conditions at room temperature.

I shall show you the experiment. To 10 ml of *M* alanine solution we add 10 ml potassium carbonate solution. If we now add 30 ml of a solution containing 160 g mercuric acetate per liter of methanol, a precipitate immediately separates. The amino acid itself is not precipitated by the reagent. If, however, any soluble carbonate is added, a dense precipitate of pure white flakes immediately separates. In the absence of the amino acid, the alkalicarbonate solution forms a yellowish-red basic mercuric acetate precipitate[16].

Ladies and Gentlemen—this is the end. I hope to have demonstrated to you that important biochemical reactions take place at great speed. Under physiological conditions, such reactions undoubtedly proceed momentarily. This statement by Liebig always remains valid: 'In a comprehensive view of the phenomenon of nature, we have no scale for that which we are accustomed to name small or great... That which is scarcely observable in a confined district appears inconceivably large when regarded in its extension through unlimited space'. The sentence refers to the continuous solution of phosphates by the cataracts of the River Nile to which the almost legendary fertility of the Nile Valley is ascribed.

Zusammenfassung

Es werden einfache Vorlesungsversuche beschrieben für Phosphorylierung, Dephosphorylierung, Abfangmethode, Auflösung des anorganischen Bestandteils von Knochen und Zähnen in neutralem Medium, Hydrotropie, momentane Bildung freier Säure beim Zusammenbringen von zwei neutralen Substanzen, momentanen Eintritt der Carbamatreaktion. Die einzelnen Reaktionen wurden derart modifiziert, dass sie in einer etwa einstündigen Vorlesung vorgeführt werden können.

[11] C. Neuberg, Biochem. Z. *76*, 107 (1916).

[12] F. Wöhler, Z. Physiol. *1*, 305 (1825).

[13] I. S. Forrest, A. Grauer, M. Kreidl, and C. Neuberg, Arch. Biochem. Biophys. *55*, 555 (1955).

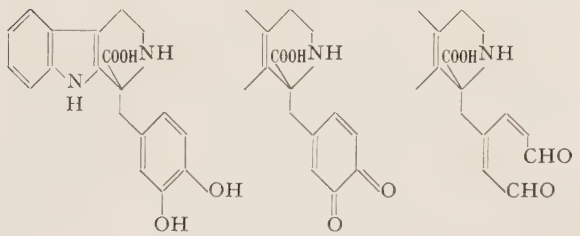
[14] E. Erlenmeyer and O. Siegel, Liebigs Ann. *177*, 128 (1875).

[15] C. Neuberg and M. Ishida, Biochem. Z. *37*, 142 (1911).

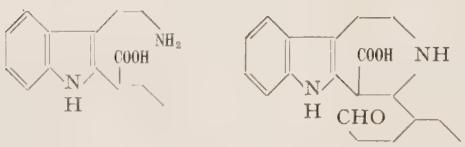
[16] C. Neuberg, A. Grauer, and M. Kreidl, Arch. Biochem. Biophys. *58*, 169 (1955).

The Biogenesis of the *Tabernanthe Iboga* Alkaloids*

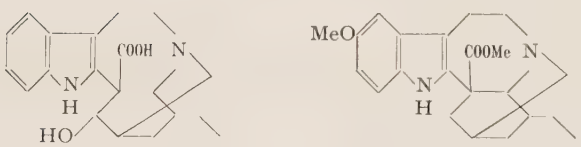
In recent years much progress has been made on the part of chemists to develop a set of working hypothesis by which the biosynthesis of indole alkaloids might be explained in broad outline[1]. In this way the structures of such apparently unrelated compounds as strychnine, yohimbine, ajmaline and cinchonine have been rationalized. Since the ring system of the major *Tabernanthe iboga* alkaloids, ibogaine, ibogamine and tabernanthine, has now been shown to be that in (VIII)[2], it seemed appropriate to consider how it might be possible to account for its formation based on the existing theories.



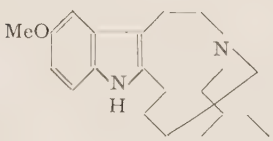
(I) (II) (III)



(IV) (V)



(VI) (VII)



(VIII)

A plausible route starts from the α-type condensation product (I) derived from tryptophan and 3:4-dihydroxyphenylalanine. Ring C can become seven membered as a consequence of an elimination followed by readdition of the basic nitrogen, activation for the first step being provided by a carbonyl group either in an *o*-quinone [such as (II)] or in the Woodward fission product (III). The Michael type ring closure of (IV) in the second step to finally yield (V) requires little comment. Mannich condensation with formaldehyde and ring closure completes the elaboration of the skeleton (VI), whose conversion into voacangine[2] (VII) or ibogaine (VIII) offers no difficulty[3]. One is lead to speculate on the possible occurrence of alkaloids similar to (VI) which would contain a hydroxyl in the position shown. The high molecular weight Voacanga alkaloids, e.g., voacamine[4] and voacorine[5] may well arise from intermediates in such a biogenetic scheme as suggested above.

W. I. Taylor

CIBA Pharmaceutical Products Inc., Summit, N. J., USA., July 23, 1957.

Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit schlägt eine Biogenese der Tabernanthe-Alkaloide vor, die von einem α-Kondensationsprodukt von Tryptophan mit 3,4-Dioxyphenylalanin ausgeht. Der siebengliedrige Ring C dieser Alkaloide entsteht durch Ringöffnung und erneute Ringschliessung eines Oxydationsproduktes. Weitere Stufen umfassen eine Mannich-Kondensation, eine Reduktion und einen Ringschluss zu einer Hydroxycarboxyverbindung, aus der durch einfache Reaktionen Voacangin und Ibogain abgeleitet werden können.

* The Alkaloids of *Tabernanthe Iboga*, Part V.

[1] For a recent summary see R. Robinson, *The Structural Relations of Natural Products* (Oxford at the Clarendon Press, 1955), p. 100.

[2] W. I. Taylor, J. Amer. chem. Soc. *79*, 3298 (1957).

[3] It is already known that voacangic acid suffers decarboxylation in acidic media to furnish ibogaine [M.-M. Janot and R. Goutarel, C. R. Acad. Sci. Paris *241*, 986 (1955)]. Compare the analogous decarboxylation of 2-substituted 2-carboxy-β-carbolines [G. Hahn, L. Bärwald, O. Schales, and M. Werner, Ann. *520*, 107 (1935)].

[4] R. Goutarel, F. Percheron, and M.-M. Janot, C. R. Acad. Sci. Paris *243*, 1670 (1956).

[5] R. Goutarel and M.-M. Janot, C. R. Acad. Sci. Paris *242*, 2981 (1956).

Hydroxyproline Production in Chick Fibroblast Cultures

Introduction.—While it is well known that argyrophil fibres develop in fibroblast cultures, histological methods provide at best an inadequate quantitative assessment of their production. Hydroxyproline is an imino acid found in collagen, reticulin and in certain soluble substances which are probably their precursors (Harkness *et al.*[1], Orekhovitch *et al.*[2]). We thought it of interest to measure quantitatively the production of hydroxyproline in chick aorta cultures as an index of their formation of extracellular fibre material. 18-day embryos were used with culture periods of 10, 21 and 28 days.

It has been suggested (Stetten[3]) that proline is a precursor of hydroxyproline, and we have further assessed the effect of proline enrichment on hydroxyproline formation.

Materials and Methods

Cultures.—White Leghorn eggs were used and incubated at 38°C for 18 days. Embryos were removed under aseptic conditions, the thorax opened, and the heart and proximal parts of the great vessels removed. The latter were cut into small pieces of about 1 mm³ for culture. Cultures were continued to 10, 21 and 28 days.

[1] R. D. Harkness, A. M. Marko, H. M. Muir, and A. Neuberger, Biochem. J. *56*, 558 (1954).

[2] N. N. Orekhovitch, K. D. Tustanovsky, K. D. Orekhovitch, and N. E. Plotnikova, Biochimia *13*, 55 (1948).

[3] M. R. Stetten, J. biol. Chem. *181*, 31 (1949).

For 10-day cultures 2 eggs were used at a time to provide a pool of 40–80 inocula. Half of these were weighed and estimated at once for hydroxyproline. The remainder were cultured in hollow slides in groups of 10 with a drop of 50% fowl plasma and the same volume of 33% chick embryo extract containing 50 μg/ml of added ascorbic acid. At 10 days, culture-bearing areas were excised from the plasma clot, weighed, and estimated for hydroxyproline, as was the remaining plasma.

21-and 28-day cultures were made from pools of about 150 innocula obtained from four embryos. By the use of a table of random numbers 30 of these innocula were selected for immediate determination of hydroxyproline, and were weighed together in a sealed bottle. 60 of the remaining pieces were cultured in groups of 10 in Carrel flasks in a medium consisting of 50% fowl plasma and 50% by volume of 10% chick embryo extract. Ascorbic acid was added to the medium to produce a final concentration of 50 μg/ml. The remaining 60 pieces were treated in a similar way with the exception that the medium in each flask contained 5 μg of added proline.

After 5 or 6 days 0·5 ml of 10% embryo extract containing 25 μg ascorbic acid, was added to each flask. The extract for those in which the effect of proline was tested contained in addition a further 5 μg of added proline. At 10–12-days and subsequently at 5–6-day intervals, the extract was renewed. The supernatant fluid phase was removed from the flasks for hydroxyproline estimation before addition of new extract. At 21 or 28 days, supernatant fluid was again removed for hydroxyproline analysis, and culture containing areas were cut from the plasma clot. Their hydroxyproline content was determined, as was that of the plasma clot remaining after their excision. Thus each pool of about 150 inocula provided cultures analysed at 21 and 28 days, half of which were enriched with proline.

Initial determinations of the hydroxyproline content of embryo extract and plasma were made for all experiments. Four or six Carrel flasks were also incubated as controls for each 21–28-day experiment, half with and half without added proline, but containing no cultures. Embryo extract was added to these controls and supernatant removed for analysis as already described.

Chemical Method.—After colour development by the method of NEUMAN and LOGAN[4] hydroxyproline content was determined by absorption measurements in a Zeiss spectrophotometer over the 540–640 mμ range. Maximum absorption was at 560 mμ and readings were corrected for general density of the sample following LOTHIAN[5]. The validity of this procedure was checked by recovery experiments in which known amounts of standards were added to embryonic extract.

Proline was obtained from Hoffmann-La Roche. A solution containing 50 μg/ml was prepared and sterilised by filtration, and estimated for contamination by hydroxyproline.

Calculation of Results.—For 10-day cultures, increases in hydroxyproline were found in both the excised culture bearing areas and in the remaining plasma. In addition, for 21-and 28-day cultures, hydroxyproline was found in the supernatant.

Total hydroxyproline production ascribed to the cultures was obtained by summation of values from these sources, with the necessary deduction of any contribution due to the initial plasma.

The proportionate weights of cells and plasma excised were unknown. At worst plasma could have constituted the whole weight of excised culture area, and we have consequently, in the cases where hydroxyproline was detected in the initial plasma, deducted from the total the amount of hydroxyproline contained in a weight of such plasma equal to that of the excised areas.

Results

As was to be expected, no hydroxyproline was produced as a consequence of incubation of plasma and embryo extract. The proline used was found to contain about 2% hydroxyproline as an impurity, and results have been corrected accordingly. Mean recovery of known amounts of hydroxyproline added to embryo extract to assess the reliability of the chemical method was 97·5 ± 5·0% for 27 estimations.

10-Day Cultures.—10 experiments were done in all. The numbers of cultures made in each of these ranged from 40 to 150, and for simplicity of presentation all results given subsequently in the text are expressed in terms of 10 cultures.

On this basis, inocula investigated before culture as controls had a mean wet weight of 10·5 ± 0·7 mg, and a hydroxyproline content 2·54 ± 0·35 μg. Culture-bearing areas excised from the plasma clot after 10 days cultivation had a mean wet weight of 92·9 ± 4·2 mg, and a hydroxyproline content of 4·76 ± 0·5 μg.

Of the five batches of plasma used to make up the media, only one contained detectable amounts of hydroxyproline, but at 10 days the plasma remaining after excision of the culture areas contained appreciable amounts (3·13 ± 0·73 μg).

After appropriate deduction for initial plasma hydroxyproline as described in *Methods* mean hydroxyproline increase in the culture areas was 2·27 ± 0·56 μg and in the remaining plasma 2·57 ± 0·56 μg. Thus of the total hydroxyproline increase of 4·84 ± 1·26 μg, some 53% was found in the plasma remaining after the culture-bearing portions had been excised.

21- and 28-Day Cultures.—Six experiments were done, and in all 635 cultures were made. In the text results are again presented in terms of 10 cultures, and on this basis the mean wet weight of control inocula was 12·87 ± 0·67 mg, and their hydroxyproline content 5·07 ± 0·55 μg.

In those cultures continued to 21 days, culture-bearing areas excised from the plasma clot had mean wet weights of 147·72 ± 22·67 and 119·35 ± 26·89 mg respectively for material with and without proline enrichment. Corresponding hydroxyproline means were 10·63 ± 1·77 and 9·47 ± 0·90 μg, and in neither case do these means differ significantly.

In half the experiments the plasma used contained measurable amounts of hydroxyproline, but that remaining after excision of the culture-bearing areas showed no consistent pattern of hydroxyproline increase. Indeed, in the two cases the plasma hydroxyproline content diminuished slightly. This was not true, however, of the supernatant fluid, which in all cases contained appreciable hydroxyproline when removed from the cultures whereas it contained none when prepared as embryonic extract. The mean hydroxyproline content of supernatant removed from proline-enriched cultures was 7·5 ± 1·3 μg and from non-enriched cultures 6·2 ± 0·7 μg. The mean total increase for cultures with added proline, corrected for initial plasma hydroxyproline (see *Methods*) was 15·13 ± 1·96, and for the remainder 11·93 ± 2·35 μg.

The results from comparable 28-day cultures follow a similar pattern. Mean wet weight of excised material was 126·06 ± 23·2 mg for proline-enriched cultures, and their hydroxyproline content was 11·30 ± 0·85 μg. Cul-

[4] R. D. NEUMANN and M. A. LOGAN, J. biol. Chem. *186*, 549 (1950).

[5] G. F. LOTHIAN, *Absorption Spectrophotometry* (Hilger and Watts, London 1949).

ture areas without added proline had a mean weight at excision of 156·80 mg, and a hydroxyproline content of 8·33 ± 0·46 μg. As in the 21-day cultures, the plasma increase was slight but the supernatant removed during culture had 7·32 ± 0·68 μg of hydroxyproline in proline-enriched cultures and 7·78 ± 0·61 in the remainder. The overall increase in hydroxyproline attributable to the cultures was 14·7 ± 1·11 μg with added proline, and 13·1 ± 1·21 without addition.

Thus for both 21- and 28-day cultures, although corrected hydroxyproline recovery was slightly higher when proline was added to the medium, the increase was not significant, and neither does it become so if 21- and 28-day cultures are grouped together for comparison.

Of the total hydroxyproline increase, about 50% was found in the supernatant fluid phase in both 21-and 28-day cultures, a distribution closely resembling that found in 10-day material.

Discussion

The application of Neuman and Logan's[4] technique to plasma containing minimal amounts of hydroxyproline may be misleading if absorption measurements are made, as they suggest, only at 560 mμ. Although there appears to be no reference to this problem in the literature, we found on occasions non-specific absorption at 560 mμ, shown by the fact that there was no peak at this wavelength if measurements were made over the range from 540–640 mμ. Consequently in our experiments hydroxyproline estimations, as well as being duplicated, were derived from absorption curves over the 540–640 mμ range. (At these limits standard hydroxyproline solutions show zero absorption.) It was then possible to correct absorption peaks at 560 mμ for non-specific absorption in the customary manner.

It is probable that our figures for total hydroxyproline production by cultures are slightly underestimated, since we have subtracted from our totals the amount of hydroxyproline contained in a weight of initial plasma equal to that of the excised culture areas (see 'Calculation' of *Results*). Clearly the weight of the excised areas was in part attributable to the cells they contained, although it was impossible to determine the relative proportion of cells and plasma. Our correction, however, although excessive, excluded the possibility of overestimation.

Again, recovery experiments showed our method to give slightly reduced values for hydroxyproline (97·5%).

It is by now well established by ordinary histological means (e.g. Maximov[6]), by electron microscopy (e.g. Porter and Vanamee[7]) and by chemical techniques (Gerarde and Jones[8]) that collagen is a product of the metabolic activity of fibroblasts, and consequently some increase in hydroxyproline in culture was to be expected. In our experiments, however, some 50% of the total hydroxyproline was found in the supernatant embryo extract removed from 21- and 28- day cultures, while most of the remainder was present in the excised culture-bearing areas. Thus, at least 50% of the hydroxyproline produced was in a freely diffusible form. It is possible that this finding indicated the presence of soluble forms, or even precursors, of collagen (Harkness[1], Orekhovitch[2], James[9]). The further possibility, that collagen fibres should be deposited at some distance from the cells via a soluble intermediary, receives some support from the literature (Doljanski and Roulet[10]), and it is known that collagen can be precipitated from solution (Vanamee and Porter[11]), although electron microscopic studies suggest fibril formation both within, and in the immediate vicinity of, the cell (Jackson[12]).

In the absence of evidence to the contrary, it seems likely that our measurements of hydroxyproline in the excised culture areas provide mainly an index of fibril and fibre formation so frequently reported histologically. They in fact provide no guide as to the form of the diffused hydroxyproline material, and further experiments are necessary to solve this problem.

Another point of interest lies in the timing of hydroxyproline production. While a twofold increase occurred by the 10th day, this was not comparable with the eightfold increase recorded by Gerade and Jones[8] by the 12th day. They, however, were working with adult fibroblasts in roller tube culture. By 21 and 28 days there was in our experiments a significant increase over the 10-day figures, although no such difference existed between the 21- and 28-day results themselves. These findings agree well with those of Hass and MacDonald[13] whose histological studies of fibroblast cultures showed collagen deposits at 6–8 days, increasing in amount until 14–16 days. They suggested, however, that after this time collagen began to be reabsorbed, and our experiments offer no confirmation of this possibility.

Comparison can be made between hydroxyproline formation in culture and collagen deposition in repairing wounds. Abercrombie, Flint, and James[14] studied collagen formation in rat skin repairs up to 25 days after wounding. They found a significant difference between 10- and 25-day collagen levels, but although the mean collagen content of the wounded areas was greater at 25 than at 15 days, these means did not differ significantly. While it is certain (Abercrombie and James[15]) that collagen formation in wounds continues long beyond 25 days, the parallel with our present results is striking up to this time. In culture total hydroxyproline production at 10 days was significantly less than that at either 21 or 28 days, and while the 28-day mean exceeded that after 21 days culture, these means did not differ significantly.

This work has been supported by a grant of F. Hoffmann La Roche, Basle and we are grateful also to the Wellcome Foundation for providing one of us (D.W.J.) with a travel grant.

L. Hulliger*, D. W. James**, and M. Allgöwer***

Department of Surgery, University of Basel (Switzerland), 17. September 1957.

Zusammenfassung

Kulturen von Hühnerherzfibroblasten wurden nach 10, 21 und 28 Tagen *in vitro* auf ihren Gehalt an Hydroxyprolin – einer wichtigen Aminosäure des Kollagens – untersucht. Nach 10, bzw. 21 Tagen ist eine signifikante, durch Prolinzugaben nicht beeinflussbare Vermehrung des zu 50% löslichen Hydroxyprolins feststellbar.

[6] A. Maximov, Zbl. allg. Path. path. Anat. *43*, 145 (1928).

[7] K. R. Porter and P. Vanamee, Proc. Soc. exp. Biol. N. Y. *71*, 513 (1949).

[8] H. W. Gerarde and M. Jones, J. biol. Chem. *201*, 553 (1953).

[9] D. W. James, J. Path. Bact. *69*, 33 (1955).

[10] L. Doljanski and F. Roulet, Virchow's Arch. *291*, 260 (1933).

[11] P. Vanamee and K. R. Porter, Fed. Proc. *10*, 263 (1951).

[12] S. F. Jackson, Proc. Roy. Soc. [B] *142*, 536 (1954).

[13] G. Hass and F. McDonald, Amer. J. Path. *16*, 525 (1940).

[14] M. Abercrombie, M. H. Flint, and D. W. James, J. Embryol. exp. Morph. *2*, 264 (1954).

[15] M. Abercrombie and D. W. James, J. Embryol. exp. Morph. *5*, 171 (1957).

* University of Florida, Gainsville.

** University College, London.

*** Kantonsspital, Chur.

Hypertensive Eye Lesions in the Rat. Effect of Carotid Ligation

It has previously been reported that the hypertensive encephalopathy produced by chronic administration of desoxycorticosterone acetate (DCA) can be prevented by ligation of both carotid arteries[1]. When one artery is tied, the cerebral hemisphere on the same side is protected, whereas the contralateral hemisphere is edematous and shows extensive hemorrhages. Protection has been ascribed to the failure of the blood pressure to rise in the head area after ligation.

The present paper describes the eye lesions seen in hypertensive rats and the influence of ligation of one or both carotid arteries on their development.

Materials and Methods. 75 female rats of the Upjohn strain (originally from Sprague-Dawley) of an average body weight of 50 g were divided into four groups as follows:

Group I: 8 rats, untreated controls;
Group II: 20 rats, DCA + sham left carotid ligation;
Group III: 21 rats, DCA + left carotid ligation;
Group IV: 26 rats, DCA + bilateral carotid ligation.

On *day 0* the right kidney was removed in all animals and NaCl 0·9% given as drinking fluid, to sensitize the animals to the hypertensive effect of DCA. In groups II, III and IV a DCA pellet of 25 mg was implanted subcutaneously in the dorsal region. In groups III and IV the left common carotid artery was ligated whereas in group II the same vessel was exposed but not tied. All these operations were performed under ether anesthesia in a single step. On *day 10* a second pellet was implanted subcutaneously under ether anesthesia in animals of groups II, III and IV. Implantation of DCA pellets has been shown repeatedly to produce in rats a syndrome of malignant hypertension[2]. Finally on *day 12*, the right carotid artery in group IV was ligated. The fluid intake was measured daily. Special care was taken to note any ocular changes. The experiment was terminated after 42 days. At autopsy, both eyes were removed and, after gentle extraction of the lens, were fixed in formaldehyde 10% for histological examination.

Results. Mortality Rate. Animals of group II (DCA without ligation) began to die earlier than those of groups III and IV, which had a unilateral and bilateral ligation respectively, and at the end of the experiment a significantly higher percentage of rats had died in this group as compared to the last two (Table II). This confirms earlier results showing the marked protection afforded by carotid ligation in hypertensive animals[1]. Most of the DCA-treated rats showed advanced nephrosclerosis and myocarditis in addition to widespread periarteritis nodosa.

Brain Lesions. Table I summarizes the brain changes. It can be seen that in the unligated DCA-treated rats (group II) the lesions (edema and hemorrhage) were distributed on both sides and these were mostly on the surface of the brain. On the other hand, in the rats ligated on the left side (group III), only the right hemisphere showed lesions; finally, the brain was normal in animals having a bilateral ligation (group IV). This demonstrates the effectiveness of this surgical procedure to counteract hypertensive organic lesions in a given territory.

[1] A. Robert, Circulation Research *4*, 527 (1956).

[2] H. Selye, C. E. Hall, and E. N. Rowley, Canad. med. Ass. J. *49*, 88 (1943). – F. M. Friedman, C. L. Friedman, and G. R. Polley, Amer. J. Physiol. *153*, 226 (1948). – E. Salgado, Endocrinol. *55*, 377 (1954).

Table I
Effect of Carotid Ligation on the Development of Hypertensive Encephalopathy*

Group No. Rats	DCA 20	DCA + Left 21	DCA + Both 26
Edema			
Left hemisphere	18	0	0
Right hemisphere	18	17	0
Hemorrhage			
Left hemisphere only	6	0	0
Right hemisphere only	2	17	0
Both hemispheres	7	0	0
Total	15	17	0

* Values indicate number of rats showing the pathological change

Eye Changes. Pathological changes in the *iris* were noted in a high percentage of DCA-treated animals. The lesion appeared first either as small white spots or as a rather large patchy area extending to about ⅓ of the corneal surface through which it could be seen. In some cases, almost all the iris became involved. The pupil was deformed and usually eccentric. Sometimes the white spots were accompanied by red streaks and in other instances there was a frank hemorrhage within the eye. Frequently the anterior chamber contained a big clot (Fig. 1 *B*). Histological examination showed in the iris and the ciliary body the presence of scar tissue which was probably formed as a consequence of hemorrhage in these organs. Usually, the vessels of the iris arterial circle were found to be hyalinized and their wall partially necrotic (Fig. 1 *C*). This lesion of arteriolonecrosis was of the same type as that seen in other areas, with the differences that there was a less marked periarteritic reaction as in the case of the mesenteric or renal arteries. In many animals, large, often multiple cystic formations appeared within the iris, markedly distending its structure; these cavities contained blood and were obviously the result of intrairidal hemorrhages. When there had been extensive hemorrhage in the anterior chamber of the eye, the cornea was inflamed (Fig. 1 *C*). The retina in most cases appeared normal. Only in a few instances were the arterioles of the retina thickened and their wall slightly hyalinized. This change was by far less frequent than the lesions in the iris and the ciliary body and it is noteworthy that it never led to hemorrhage. This is in contrast with the hypertensive lesions seen in man which are localized in the retinal vessels. All these changes (arteriolonecrosis and hemorrhage in the iris and ciliary body) were present in either eye in unligated rats (group II) and often bilaterally, but they appeared *only on the right side* in the animals of group III which had their left carotid artery ligated. Finally, the eyes remained normal in bilaterally ligated rats (group IV) in spite of the fact that extensive hypertensive vascular

Table II
Mortality Rate and Incidence of Eye Lesions on the 38th Day

Group	Mortality Rate %	Incidence of Eye Lesions %
Group II, DCA	60	56
Group III, DCA with unilateral ligation	28	73

lesions were found in organs situated below the site of ligation, e.g., nephrosclerosis, periarteritis nodosa.

Fig. 2, which gives the incidence of eye lesions in groups II and III, shows that the changes appeared first between the second and third week. Until the 32nd day, the incidence of animals showing the lesions was almost identical in both groups. From the 33rd day on, there was an increased tendency of the animals with unilateral ligation to develop the lesions but, as said before, on the unligated side only. Since these eye lesions appear late in the course of DCA treatment, their higher incidence in group III is likely to be due to the fact that in this group more animals were living during the latter part of the experiment, thus allowing more

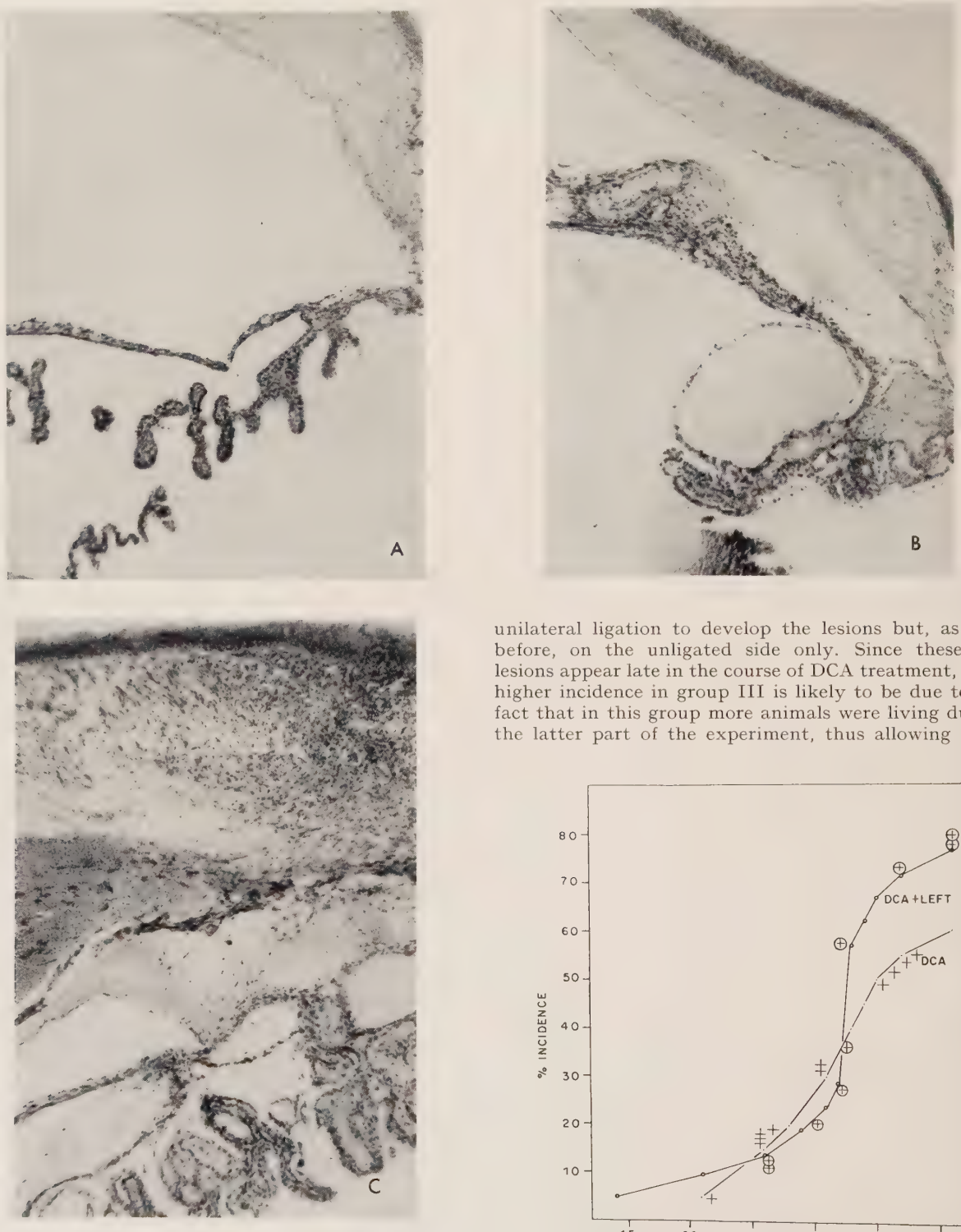


Fig. 1.—On top, the cornea; on the bottom, the iris. Magnification: 110 ×. *A* Normal eye. *B* and *C* Eyes of animals treated with DCA for 42 days. *B* Note hyalinization of arteries in the ciliary body and in the iris. Also, cystic formations due to intra-iridal hemorrhage. Cornea is normal. *C* Massive hemorrhage in the anterior chamber of the eye with secondary corneal inflammation. Marked arteriolonecrosis in the iris as in B.

Fig. 2.—Incidence of eye lesions in DCA-treated animals, with and without carotid ligation. There is increased incidence after unilateral ligation but only on the opposite side. At the same time the survival rate is prolonged after an unilateral ligation. Each plus (+) indicates the death of an animal.

time for the pathological changes to develop in the unprotected eye. This is best illustrated by a correlation between mortality rate and incidence of eye lesions. For instance, on day 38, at a time when ocular changes were almost maximum, the relation was as indicated in Table II. It is also possible that the systemic blood pressure–which was not determined–was higher in group III than in group II; if this were the case, this may have contributed to a greater incidence of eye lesions in group III.

Discussion. It is evident that carotid ligation significantly protected the animals against some of the most serious complications of malignant hypertension. The protection seems to be due to the fact that by ligating the artery, the blood pressure could not rise in the head area following administration of DCA. Therefore, it is likely that the mere elevation in blood pressure plays a prominent role in the pathogenesis of vascular lesions found in the eye and the brain in malignant hypertension. It is too early to know what practical application could be made of such a treatment.

Acknowledgment. The authors are indebted to Mr. Eugene E. Beals for the photomicrographs.

A. Robert and J. E. Nezamis

Department of Endocrinology, The Upjohn Company, Kalamazoo (Michigan), May 22, 1957.

Résumé

1° Un syndrome d'hypertension maligne a été reproduit chez le rat par l'administration d'acétate de désoxycorticostérone (DCA). Ce traitement produisit de l'artériolonécrose des vaisseaux de l'iris et du corps ciliaire, des hémorrhagies dans la chambre antérieure de l'œil ainsi que de l'œdème et des hémorrhagies cérébraux. 2° Ces lésions, oculaires et cérébrales, furent complètement prévenues par une ligature bilatérale de l'artère carotide primitive, probablement par suite d'une diminution de pression sanguine dans la région de la tête. Après une ligature unilatérale, l'œil homolatéral restait normal tandis que les lésions apparaissaient dans l'autre œil; de même, l'hémisphère cérébral homolatéral était normal alors que l'hémisphère contralatéral montrait un œdème marqué et de nombreuses hémorrhagies. 3° Le rôle pathogénique de l'hypertension *per se* est discuté brièvement.

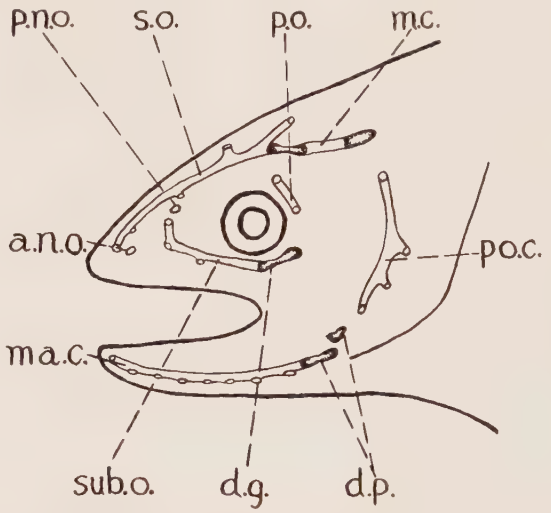
Sensory Canals of the Head in *Wallagonia attu* (Day)

All available descriptions of the sensory canals of the head in Siluroid fishes indicate a general pattern of their disposition. The author has, however, noted certain features in *Wallagonia attu* which differ from the types hitherto described and which appear exceptional. The following description of the distribution of the main canals is based on studies of specimens measuring 25 mm to 28 mm in length.

(1) The infra-orbital canal consists of (a) the sub-orbital, and (b) the post-orbital parts.

(a) The sub-orbital part starts with a pore below the posterior nasal opening, runs downwards for a short distance and then opens to the outside by a pore. The first sense organ is lodged in this region. Beyond this pore, it turns posteriorly and after running for some distance, communicates with the exterior by another pore. The second and third sense organs are located on either sides of this pore. Continuing further backwards below the eye, it finally passes over as an open dermal groove, until it loses its existence below the posterior limits of the orbit. The fourth and the last sense organ of the sub-orbital part is located in the region of the open dermal groove.

(b) The post-orbital part is a short canal, running obliquely behind the eye. It opens by two pores along its course and lodges one sense organ. There is no evidence, whatsoever, of any continuity between the sub-orbital and the post-orbital parts of the infra-orbital canal, or, between the latter and the supra-orbital canal.



Diagrammatic view of the head of a 28 mm long *Wallagonia attu*, showing the course of the sensory canals with their openings. *a.n.o.* anterior nasal opening; *d.g.* dermal groove; *d.p.* dermal pits; *ma. c.* mandibular canal; *m. c.* main canal; *po. c.* preopercular canal; *p.n.o.* posterior nasal opening; *p.o.* post-orbital part; *s.o.* supra-orbital canal; *sub.o.* sub-orbital part.

(2) The supra-orbital canal starts by a pore placed just anterior to and above the level of the anterior nasal tubular opening. It then takes a short oblique course dorsally and opens to the outside by a pore. The first sense organ is placed in this region. As it runs posteriorly, it gradually acquires a dorsal position and lodges three more sense organs. At its posterior extremity, it gives off a dorsal backwardly directed branch, which possesses one sense organ. After a short distance it opens and is subsequently lost.

The junction between the supra-orbital canal and the main canal of the head is marked by a large double pore. Beyond this point, a fully developed main canal is discernible, which lodges definite sense organs.

(3) The preoperculo-mandibular canal is also distinguishable into two parts—the mandibular and the preopercular, which are not continuous with each other. The mandibular part has eight pores and nine sense organs—the last two of which are situated in open dermal pits. Close to this point, a little dorsally, a pore leads into the preopercular canal, which at first runs obliquely along a postero-dorsal course, but soon turns abruptly in a dorso-vertical direction. Finally, it ends by a pore situated at some distance from the main canal. The preopercular canal possesses three sense organs in all and does not communicate with the main canal.

Pollard[1], Collinge[2], and others, working on Siluroid fishes, state that the supra-orbital and infra-orbital canals join each other and then continue backwards as the main canal of the head. In a 30 mm long specimen of *Callichthys paleatus*, Pollard[1] states that the infra-orbital canal runs almost in a continuous line with the supra-orbital, and even in a 25 mm long specimen of *Trichomycterus tenuis*, in which he regards the condition as larval, he found the two canals continuous. Herrick[3], quoted by Lekander[4], also states that in a 25 mm long specimen of *Menidia*, the canals had assumed largely the same appearance as in the adult. But as is evident, such a condition has not been reached even upto the 28 mm stage of *Wallagonia attu*.

The preoperculo-mandibular canal in *Wallagonia attu* is also independent of the main canal at all the stages examined. Such a condition has also been figured in *Amiurus melas* by Herrick[5], in *Callichthys littoralis* by Collinge[2], and in *Amiurus catus* by Allis[6] and Wright[7]. Contradictory to the results of Allis[6] and Wright[7], Collinge[2] maintains that in *Amiurus catus*, the 'opercular canal' is continuous with the main canal.

A. S. Kapoor

Department of Zoology, University of Allahabad (India), June 13, 1957.

Zusammenfassung

Das Studium der Sinneskanäle im Kopf des *Wallagonia attu* (Day) bis zu 28 mm Länge ergab, dass der präoperkulare Kanal sich nicht bis an den temporalen Hauptkanal erstreckt, dass der mandibulare Kanal sich nicht mit dem präoperkularen Kanal vereinigt und der infraorbitale Kanal nicht vollständig ausgebildet ist und sich nicht mit dem supraorbitalen vereinigt.

[1] H. B. Pollard, Zool. Jb. *5*, 525 (1892).
[2] W. E. Collinge, Proc. zool. Soc. London *1895*, 274.
[3] C. J. Herrick, J. comp. Neurol. *9*, 3 (1899).
[4] B. Lekander, Acta zool. *30*, 1 (1949).
[5] C. J. Herrick, J. comp. Neurol. *11*, 177 (1901).
[6] E. P. Allis, J. Morph. *2*, 463 (1889).
[7] R. R. Wright, Proc. Canad. Inst. [n.s] *2*, 251 (1884).

DISPUTANDUM

The Heat of the Reaction *trans*→*cis* $[Coen_2Cl_2]^+$ in Aqueous Solution

Haworth, Neuzil, and Kittsley[1] have recently investigated the equilibrium

$$trans\text{-}[Coen_2Cl_2]^+ \rightleftarrows cis\text{-}[Coen_2Cl_2]^+$$

in solution by a spectrophotometric method, and from the temperature dependence of the equilibrium constant they have found ΔH over the temperature range 1–36° to be + 31·4 kcal. If this result were correct, it would be of the greatest interest, since it implies that bond strengths in the two isomers are widely different. Investigation of the infra-red spectra of *cis*- and *trans*-bischlorobisethylenediamine cobaltic chlorides from 450 to 3500 cm^{-1} does not support this conclusion; corresponding bands differ nowhere by more than a few wavenumbers. In the 500 cm^{-1} region, where Co–N vibration frequencies should be found[2], the observed frequencies are: *cis*-compound, 575, 507, and 457 cm^{-1}; *trans*-compound, 585, 512, and 470 cm^{-1}. These figures suggest very little difference in bond strengths. Furthermore, published data[3] for the heats of solution and of decomposition by aqueous sodium sulphide of both isomers lead to a value of + 1·8 kcal.

We are therefore driven to conclude that Haworth *et al.* have misinterpreted their spectral data, and that, as would be expected, the isomers differ in energy by only a very small amount.

A. G. Sharpe and D. B. Wakefield

University Chemical Laboratory, Cambridge, January 30, 1957.

Zusammenfassung

Es wird gezeigt, dass der veröffentlichte Wert von $\Delta H = + 31{,}4$ kcal für die Reaktion *trans* → *cis*-$[Coen_2Cl_2]^+$ion in wässeriger Lösung zu hoch ist. Der richtige Wert ist + 1,8 kcal.

[1] D. T. Haworth, E. F. Neuzil, and S. L. Kittsley, Exper. *12*, 335 (1956).

[2] D. B. Powell and N. Sheppard, J. chem. Soc. *1956*, 3108.
[3] T. C. J. Ovenston and H. Terrey, J. chem. Soc. *1936*, 1660.

The Heat of the Reaction *trans*→*cis* $[Coen_2Cl_2]^+$ in Aqueous Solution

A Reply

Sharpe and Wakefield have criticized the value of 31·4 kcal[1] (obtained from the temperature dependence of the equilibrium constant) for the reaction

$$trans\text{-}[Co(en)Cl_2]^+ \rightleftarrows cis\text{-}[Co(en)_2Cl_2]^+$$

as being inconsistent with their interpretation of the infra-red spectra of these species. However, the following equilibria probably exist in aqueous solution[2]

$$cis\text{- and } trans\text{-}[Co(en)_2Cl_2]^+ \rightleftarrows [Co(en)_2(H_2O)Cl]^{++} \rightleftarrows [Co(en)_2(H_2O)_2]^{+++}.$$

Furthermore, there is evidence[2] that the interconversion actually occurs via the $[Co(en)_2(H_2O)Cl]^{++}$ ions instead of the dichloro complexes. Thus, the observed temperature dependence of the equilibrium constant may be due to the aquation reaction rather than differences in bond strengths in the two isomers.

S. L. Kittsley

Department of Chemistry, Marquette University, Milwaukee (Wisconsin), August 29, 1957.

[1] D. T. Haworth, E. F. Neuzil, and S. L. Kittsley, Exper. *12*, 335 (1956).
[2] J. C. Bailar, *Chemistry of the Coordination Compounds* (Reinhold Publishing Corporation, New York 1956), p. 301.

Nouveaux livres - Recensioni - Buchbesprechungen - Reviews

Proceedings of the Second International Congress on Rheology

Edited by V. G. W. Harrison

IX and 451 pages
(Butterworths Scientific Publications, London 1954)
(60 s)

Im Juli 1953 fand in Oxford der Zweite Internationale Kongress für Rheologie statt; das vorliegende Buch enthält den Wortlaut der dort gehaltenen Vorträge und in gekürzter Form die Diskussionen.

Da «alles fliesst», muss eine «Wissenschaft vom Fliessen der Materie» – vor rund 25 Jahren wurde für sie der Name «Rheologie» geprägt – ein enormes Einzugsgebiet besitzen. Tatsächlich ist die Vielfalt der in der Rheologie bzw. am Kongress behandelten Themen gross, sie spiegelt sich in den Titeln der Vorträge wider und fällt schon beim ersten Durchblättern des Buches auf: Wir finden neben Arbeiten, die den rheologischen Problemen der chronischen Bronchitis gewidmet sind, solche über die Verwendung mathematischer Funktionaltransformationen.

Auf der anderen Seite ist gerade für die heutige Rheologie auch eine gewisse Konzentrierung der Forschung und Konsolidierung der Kenntnisse typisch; auf wichtigen Teilgebieten, so auf dem des Relaxationsverhaltens vor allem der hochmolekularen Stoffe, liegen gutgesicherte und rationell dargestellte Ergebnisse vor. Auch dieser Aspekt der Rheologie kommt im Kongress und im Buch gut zum Ausdruck.

Im einzelnen gibt das Buch neben dem einführenden Vortrag die 6 Haupt- und die 49 Sektionsvorträge wieder; sie sind unter den Titeln *High Polymers* (22 Vorträge), *Viscosity and Plasticity* (19), *Biology* (3) und *Oils and Greases* (5) zusammengestellt. Die Vorträge sind in den Sprachen, in denen sie gehalten wurden – meist englisch – abgedruckt. Die Diskussionsbemerkungen sind – gut redigiert – einheitlich auf englisch wiedergegeben, ebenso die Zusammenfassungen.

Das Buch ist ausgezeichnet geeignet, um dem Leser Probleme, Methoden und Ergebnisse der heutigen Rheologie vorzuführen; weiter kann man sich an Hand des Buches in spezielle Gebiete einarbeiten. Die ausführlichen und sorgfältigen Literaturangaben sind dabei eine wertvolle Hilfe. Das Buch ist gut gedruckt, der Preis erscheint angemessen.

F. Grün

L'évolution de la lithosphère Pétrogenèse

Par H. et G. Termier

(Masson, éditeur, Paris 1955 – 1 vol. rel.)

Les auteurs de cet important ouvrage s'attachent à décrire l'histoire de notre planète. La *Pétrogenèse* est le deuxième volume d'une quadrilogie réservée à l'orogenèse, à la glyptogenèse et à l'histoire de la biosphère (déjà paru).

Les formes diverses de la matière minérale sont passées en revue de l'atome à la molécule, aux minéraux et aux roches. Les relations entre les éléments sont analysées. Le lecteur de formation naturaliste, le géologue en particulier, sera reconnaissant aux auteurs d'avoir mis à sa portée les données les plus récentes d'astrophysique, de géochimie et de cosmochimie.

A. Lombard

Bird Navigation

By G. V. T. Matthews

Cambridge Monographs in Experimental Biology, No. 3
141 pages
(Cambridge University Press, 1955)
(12/6 s.)

Bei der Besprechung des Vogelzugs und des Heimfindevermögens geht der Verfasser hauptsächlich auf das Problem der Orientierung oder Navigation in unbekanntem Gelände ein. Verschiedene Navigationstheorien werden kritisch behandelt. Die Möglichkeiten der Orientierung nach dem Erdmagnetismus oder auf Grund einer sinnesmässigen Wahrnehmung der Nestrichtung werden abgelehnt. Gestützt auf eigene, hauptsächlich mit Brieftauben durchgeführte Versuche, kommt der Verfasser zu einer neuen Theorie, nach welcher sich der Vogel nach dem Lauf der Sonne orientiert. Unter der Voraussetzung des Vorhandenseins eines sehr genauen Zeitsinnes und der Fähigkeit, kleine Winkelverschiebungen wahrzunehmen, kann der Vogel aus einer kurzen Beobachtung der Sonnenbewegung (½–1 min) seinen genauen Standpunkt ermitteln. Für diese Theorie sprechen hauptsächlich die vom Verfasser beobachteten Fehlorientierungen bei bedecktem Himmel und nach künstlicher Verschiebung des Tag-Nacht-Rhythmus.

M. Lüscher

The Physiology of Insect Diapause

By A. D. Lees

Cambridge Monographs in Experimental Biology, No. 4
151 pages
(Cambridge University Press, 1955)
(12/6 s.)

Viele Insekten und andere Arthropoden überdauern ungünstige Aussenbedingungen (Winter, Trockenperioden) in einem Zustand stark herabgesetzten Stoffwechsels, in dem kein Wachstum erfolgt, im Zustand der Diapause. Die Bedingungen, unter denen ein Insekt in Diapause verfällt oder das Wachstum wieder aufnimmt, wurden in neuerer Zeit eingehend erforscht, und der Verfasser hat dazu durch seine klassischen Untersuchungen an der roten Spinnmilbe selbst wesentliche Beiträge geleistet. Die Erforschung der Diapause ist nicht nur für die angewandte Entomologie von grosser Bedeutung; sie hat auch zur Aufklärung fundamentaler Probleme der Insektenentwicklung (zum Beispiel der hormonalen Steuerung) beigetragen. Das Buch gibt eine glänzende Übersicht über den heutigen Stand der Forschung. Besonders wertvoll ist auch das umfassende Literaturverzeichnis.

M. Lüscher

Informations - Informationen - Informazioni - Notes

STUDIORUM PROGRESSUS

Beziehungen zwischen Funktion und Stoffwechsel des Zentralnervensystems nach Pervitin

Von F. Heim, F. Leuschner und K.-J. Estler*

Die bisher über Beziehungen zwischen Funktion und Stoffwechsel des Zentralnervensystems vorliegenden Untersuchungen behandeln besonders die mit wechselndem Funktionszustand einhergehenden Änderungen der Hirnatmung, des anaeroben und aeroben Umsatzes der Kohlenhydrate, des Gehalts an energiereichen organischen Phosphatestern und anorganischem Phosphat im Gehirn. Durch die Oxydation der Kohlenhydrate wird der Hauptanteil der für die Erhaltung der Struktur und Funktion des Zentralnervensystems notwendigen Energie gedeckt. ATP dient dabei als die unmittelbare Energiequelle, während Kreatinphosphat seine Energie durch ATP überträgt, indem es ADP zu ATP rephosphoryliert. Deshalb tritt nach Dawson und Richter[1], Abood, Kun und Geiling[2], sowie Kratzing und Narayanaswami[3] bei grossem ATP-Verbrauch erst dann ein rascher Abfall der ATP-Konzentration im Gehirn auf, wenn das Kreatinphosphat weitgehend verbraucht ist. Der nach intrazisternaler Einführung von radioaktivem Phosphat gemessene Umsatz von ATP und Kreatinphosphat im Gehirn liegt nach Lindberg und Ernster[4] mit 40 μg/g/min im Gehirn etwas höher als in der Leber und Muskulatur. Die Angaben über den ATP-Gehalt des Gehirns sind auch in neueren Arbeiten sehr unterschiedlich. Sie betragen, wahrscheinlich abhängig von der verwendeten Tierspezies, den jeweils untersuchten Hirnabschnitten, dem der Tötung vorausgegangenen Erregungszustand der Tiere, der Tötungsart, der Geschwindigkeit des Einfrierens und den angewandten Bestimmungsmethoden 75 bis 650 μg ATP/g Feuchtgewicht (Albaum und Chinn[5]; Albaum, Noell und Chinn[6]; Kratzing und Narayanaswami[3]; Lebedevat, Maslowa und Rozengart[7]; Palladine[8]; Stoner und Threlfall[9]).

Die für Untersuchungen über Beziehungen zwischen Funktion und Stoffwechsel des Zentralnervensystems notwendigen Änderungen des Erregungszustandes des Zentralnervensystems wurden erzielt entweder durch Hemmung der Funktion (Narkotika), der Atmungsfermente (Cyanide), des Substratangebots (Ischämie und Anoxie) oder durch funktionssteigernde Massnahmen (elektrische Hirnreizung, zentral erregende Mittel wie Strychnin, Pikrotoxin, Kardiazol und Pervitin). Nach Hunter und Lowry[10], sowie Schmidt[11] besteht die primäre Wirkung der Narkotika in der Herabsetzung der Neuronenaktivität, die zur Senkung des ATP-Verbrauchs und diese wieder zur Atmungseinschränkung führt. Als Ausdruck des verminderten Energiebedarfs sind nach Stone[12], sowie Richter und Dawson[1]; Palladine[8]; McIlwain, Buchel und Cheshire[13]; Albaum, Noell und Chinn[6]; McIlwain[14] sowie Richter[15] in der Narkose der Glykogen-, Phosphokreatin- und ATP-Gehalt des Gehirns erhöht, Sauerstoffverbrauch, Milchsäurebildung und anorganische Phosphate dagegen vermindert. Die Senkung des Sauerstoffverbrauchs wird als Folge der Senkung des ATP-Bedarfs, die Erhöhung des ATP- und Phosphokreatingehalts des Gehirns trotz Sauerstoffverbrauchsabnahme als Zeichen des Überwiegens der synthetischen über die abbauenden Reaktionen beurteilt (Schmidt[11]). Nach Döring und Gerlach[16] bewirken Narkotika keine Konzentrationszunahme, sondern nur eine Stabilisierung der energiereichen Phosphate im Gehirn, wie sich aus Unterschieden zwischen Versuchen an nicht narkotisierten und narkotisierten, dekapitierten bzw. eingefrorenen Ratten ergeben hat. Anoxie führt nach Albaum, Noell und Chinn[6] an Kaninchen und Ratten bereits nach 70 s zur signifikanten Abnahme von ATP und Kreatinphosphat und Zunahme von Milchsäure und anorganischem Phosphat im Gehirn. Zu qualitativ gleichen Ergebnissen kamen Gromova, Kudrikaja, Petrov und Sapot[17] bei Erzeugung einer Hirnischämie durch Unterbindung beider Karotiden von Albinoratten. Cyanide verursachen nach Befunden von Albaum, Teppermann und Bodansky[18] einen Übergang von der oxydativen zur anoxydativen Energiegewinnung mit Anstieg der Milchsäure-, Hexosediphosphat- und Phosphobrenztraubensäurekonzentration, Abnahme des ATP- und Phosphokreatingehalts bei gleichzeitiger Zunahme des ADP- und anorganischen Phosphats im Gehirn.

Zur Erzielung einer Funktionssteigerung des Zentralnervensystems wurden von Klein und Olsen[19], sowie Dawson und Richter[1] elektrische Reize, von Stone[12] sowie Stone, Webster und Gurdjian[20] zentral erregende Pharmaka in krampferzeugenden Intensitäten bzw. Konzentrationen verwendet. Entsprechend der Dauer der Krampfzustände fielen im Gehirn der Gehalt an Glukose, Glykogen, ATP und Kreatinphosphat ab, während Milchsäure und anorganische Phosphate zu-

* Pharmakologisches Institut der Universität Erlangen.

[1] D. Richter und R. M. C.-Dawson, Amer. J. Physiol. *154*, 73 (1948).

[2] L. G. Abood, E. Kun und M. K. Geiling, J. Pharmacol. exp. Therap. *98*, 373 (1950).

[3] C. C. Kratzing und Narayanaswami, Biochem. J. *54*, 317 (1954).

[4] O. Lindberg und L. Ernster, Biochem. J. *46*, 43 (1950).

[5] H. G. Albaum und H. Chinn, Amer. J. Physiol. *174*, 141 (1953).

[6] H. G. Albaum, W. K. Noell und H. Chinn, Amer. J. Physiol. *174*, 408 (1953).

[7] E. M. Lebedevat, M. N. Maslova und V. D. Rozengart, Dokl. Akad. Nauk SSSR. *102*, 563 (1955).

[8] A. V. Palladine, Ukrain. Biochem. J. *26*, 112 (1954); Biochimia. Nervoi. Systemi. Kiev. *1954*; Wien. Klin. Wschr. *1954*, 473.

[9] H. B. Stoner und C. J. Threlfall, Biochem. J. *58*, 115 (1954).

[10] E. E. Hunter und O. H. Lowry, Pharmacol. Rev. *8*, 116 (1956).

[11] C. G. Schmidt in: Flaschenträger und Lehnartz, *Physiologische Chemie*, II 2*a* (Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1956), S. 813.

[12] W. Stone, Biochem. J. *32*, 1908 (1938); J. biol. Chem. *135*, 43 (1940).

[13] H. McIlwain, L. Buchel und I. D. Cheshire, Biochem. J. *48*, 12 (1951).

[14] H. McIlwain, Brit. med. Bull. *6*, 301 (1950); Biochem. Soc. Sympos. *8*, 27 (1952).

[15] D. Richter, Biochem. Soc. Sympos. *8*, 62 (1952).

[16] H. J. Döring und E. Gerlach, Verh. deutsch. pharmak. Ges., Freiburg 1957.

[17] K. G. Gromova, T. E. Kudrikaja, I. R. Petrov und V. S. Sapot, Biochemia *17*, 13 (1952).

[18] H. G. Albaum, J. Teppermann und O. Bodansky, J. biol. Chem. *164*, 45 (1946).

[19] I. R. Klein und N. S. Olsen, J. biol. Chem. *167*, 747 (1947).

[20] W. Stone, J. Webster und E. Gurdjian, J. Neurophysiol. *8*, 233 (1945).

nahmen. *In-vitro*-Versuche von McIlwain und Gore[21] sowie Kratzing[22] an elektrisch gereizten Schnitten von Mäuse- und Meerschweinchenhirn ergaben eine Zunahme der Atmung, Milchsäurebildung, des ADP und anorganischen Phosphats, während ATP und Kreatinphosphat abnahmen. Im Gegensatz zu den angeführten Reizversuchen am Zentralnervensystem führen nach Beobachtungen von Lebedevat, Maslova und Rozengart[7] durch Pikrotoxin, Kardiazol und elektrische Hirnreizung erzeugte Krämpfe, bei Aufrechterhaltung einer normalen Hirndurchblutung, nicht zu signifikanten Änderungen der Hirnkonzentration an energiereichen Phosphaten.

Abhängig von der Art und Stärke der Reizung des Zentralnervensystems wurden neben Senkungen auch Steigerungen der Hirnkonzentration an energiereichen Phosphaten beobachtet. Dawson und Richter[1] fanden im Gehirn von Ratten, die durch Rotationen in einer Trommel erregt worden waren, eine signifikante Zunahme des Kreatinphosphats. Palladine und Rybina[23], sowie Palladine[8] beobachteten an Kaninchen nach 5–10 mg/kg Pervitin in der ersten Stunde einen Abfall und in den folgenden drei Stunden eine Erhöhung des ATP-Gehalts des Gehirns über den Ausgangswert. Mit Hilfe von radioaktivem Na-Phosphat konnte Palladine[8] nach Pervitin auch eine Zunahme des ATP-Umsatzes im Gehirn nachweisen. Chajkina, Goncarova und Michajlovskaja[24] haben nach 5–10 mg/kg Pervitin eine Zunahme des Glykogengehalts und der Phosphorylaseaktivität im Gehirn von Kaninchen festgestellt.

Die Beobachtungen von Dawson und Richter[1] sowie Palladine[8], dass Formen der Erregung des Zentralnervensystems, die nur zur Steigerung der psychomotorischen Erregbarkeit der Tiere, nicht aber zu Krämpfen und Durchblutungsstörungen führen, den Gehalt des Zentralnervensystems an energiereichen Phosphaten erhöhen, haben uns veranlasst, an weissen Mäusen den Einfluss kleiner Pervitindosen (2–3 μg/g Körpergewicht), deren Wirkungscharakter einer physiologischen Erregung vielleicht am meisten entspricht, auf den ATP-Gehalt des Gehirns innerhalb der ersten sechs Stunden nach Pervitin zu untersuchen und mit gleichzeitig auftretenden Änderungen des Gesamtsauerstoffverbrauchs, der Motilität, Atemfrequenz und Rektaltemperatur zu vergleichen. Die Änderungen von Sauerstoffverbrauch, Motilität und Atmung dienten uns dabei als quantitativer Gradmesser für den jeweiligen Erregungszustand des Zentralnervensystems.

Wegen der Bedeutung des Coenzym A im Energiestoffwechsel und dessen enger Beziehung zum ATP-Umsatz haben wir gleichzeitig die Coenzym-A-Aktivität im Gehirn und ausserdem in Leber und Herzmuskel bestimmt. Coenzym A ist zur Überführung der Spaltprodukte des Zuckers und der Fettsäuren in den Zitronensäurezyklus und damit zur oxydativen Energiegewinnung notwendig. Deshalb sind die meisten energieerfordernden Prozesse, so auch die Regeneration des ATP, Kreatinphosphats und Azetylcholins, einer mit der Hirnfunktion und dem Hirnstoffwechsel eng verbundenen Überträgersubstanz, an die Anwesenheit von Coenzym A gebunden. Umgekehrt wird ATP zum Aufbau des Coenzym-A-SH aus seinen Vorstufen und zur Bildung des energiereichen Azetyl-Coenzym A und Phosphoryl-Coenzym A benötigt.

Methodik. Die Bestimmung der Motilität, der Sauerstoffaufnahme und der Rektaltemperatur erfolgte in der von Heim und Haas[25] angegebenen Weise. Als Mass der Motilität diente die von den Tieren in der Zeiteinheit zurückgelegte Wegstrecke. Zur Messung der Atemfrequenz durch Auszählen mit der Stoppuhr kamen die Tiere in kleine, aus durchsichtigem Zelluloid hergestellte zylindrische Gefässe. Die Raumtemperatur betrug 24°.

Die ATP-Bestimmung im ganzen Gehirn erfolgte nach einer von Leuschner und Estler[26] angegebenen Methode: Der Trichloressigsäureextrakt aus eingefrorenem Mäusegehirn wurde in Anlehnung an das Verfahren von Eggleston und Hems[27] papierchromatographisch aufgetrennt. Für die quantitative Erfassung des ATP eignet sich der Phosphorgehalt nicht. Mit grosser Empfindlichkeit gelingt die Bestimmung dagegen mit einem Fermentsystem nach Feldberg und Mann[28] zur enzymatischen Azetylcholinsynthese.

Die Bestimmung des Coenzym A in Gehirn, Herzmuskel und Leber erfolgte nach der Methode von Kaplan und Lipmann[29], die allerdings nicht ausschliesst, dass bei der Bestimmung ausser intaktem Coenzym A seine biologischen Vorstufen miterfasst werden. Zur Erstellung der Eichkurven wurde ein Präparat mit einem Gehalt von 75% reinem Coenzym A verwendet.

Versuchsergebnisse. In Abbildung 1*a* wurden die durch 2–3 μg/g Pervitin hervorgerufenen Veränderungen der Motilität, Sauerstoffaufnahme, Atemfrequenz und Rektaltemperatur, in Abbildung 1*b* die nach gleichen Pervitingaben beobachteten Änderungen des ATP-Gehalts des Gehirns und der Coenzym-A-Aktivität in Gehirn, Leber und Herz aufgetragen. Die 1 und 3 h nach der Pervitingabe für Motilität, Sauerstoffverbrauch, Atemfrequenz, ATP- und Coenzym-A-Gehalt im Gehirn und Herz gefundenen Werte sind auf Grund der errechneten Verteilung und der daraus ermittelten Wahrscheinlichkeit gegenüber den Ausgangswerten signifikant erhöht. Die 3 h nach Pervitin gemessene Coenzym-Aktivität der Leber ist gegenüber dem Leerwert signifikant erhöht, der 1- und 6-Stunden-Wert dagegen nicht. Die Rektaltemperatur sinkt nach Pervitin im Gegensatz zu allen anderen untersuchten Funktionen ab und erreicht erst nach 12–24 h den Ausgangswert.

Nach unseren Befunden lösen 2–3 μg Pervitin/g Maus eine zentrale Erregung mit Funktionsänderungen aus, die nach Art und Stärke die physiologischen Grenzen nicht überschreiten. Sie gehen mit einer dem Erregungsgrad entsprechenden Zunahme der absoluten ATP-Konzentration im Gehirn einher[30]. Im Gegensatz dazu sinkt, wie die oben erwähnten Befunde anderer Autoren gezeigt haben, nach unphysiologisch starker Reizung des

[21] H. McIlwain und M. B. R. Gore, Biochem. J. *50*, 24 (1951); *54*, 305 (1953).

[22] C. C. Kratzing, Biochem. J. *54*, 312 (1953).

[23] A. V. Palladine und A. A. Rybina, Dokl. Akad. Nauk SSSR. *91*, 903 (1953).

[24] B. I. Chajkina, E. E. Goncarova und L. A. Michajlovskaja, Dokl. Akad. Nauk SSSR. *96*, 347 (1954).

[25] F. Heim und B. Haas, Arch. exp. Path. Pharmak. *226*, 395 (1955).

[26] F. Leuschner und K. J. Estler, Hoppe-Seylers Z. *308*, 141 (1957).

[27] L. V. Eggleston und R. Hems, Biochem. J. *52*, 156 (1952).

[28] W. Feldberg und T. Mann, J. Physiol. *104*, 411 (1946).

[29] N. O. Kaplan und F. Lipmann, J. biol. Chem. *174*, 37 (1948).

[30] *Anmerkung bei der Korrektur.* Der Anstieg der ATP-Konzentration im Gehirn von pervitinerregten Mäusen konnte durch Kontrolluntersuchungen mit dem optischen Fermenttest zur ATP-Bestimmung nach Th. Bücher, Adv. Enzymol. *14*, 1 (1953), der aus der Hauptreaktion D(−)-3-Phosphoglycerinsäure + ATP $\rightleftarrows$ D-1,3-Diphosphoglycerinsäure + ADP und der Hilfsreaktion D-1,3-Diphosphoglycerinsäure + DPN-H + $H^+ \rightleftarrows$ D(+)-Glycerinaldehyd-3-phosphorsäure + anorganisches Phosphat + DPN^+ besteht, bestätigt werden. Unterschiedlich erwies sich lediglich der höhere normale Ausgangswert und ein relativ höher liegender 6-Stunden-Wert nach der Injektion.

Zentralnervensystems dessen ATP-Gehalt ab. Vermutlich wird unter physiologischen Erregungsänderungen die oxydative Phosphorylierung im Gehirn so gesteigert, dass die ATP aufbauenden die energieverbrauchenden Stoffwechselvorgänge überwiegen und dabei das Gehirn seine ATP-Reserven erhöht. Unter Krämpfen dagegen liegen die Verhältnisse wahrscheinlich umgekehrt.

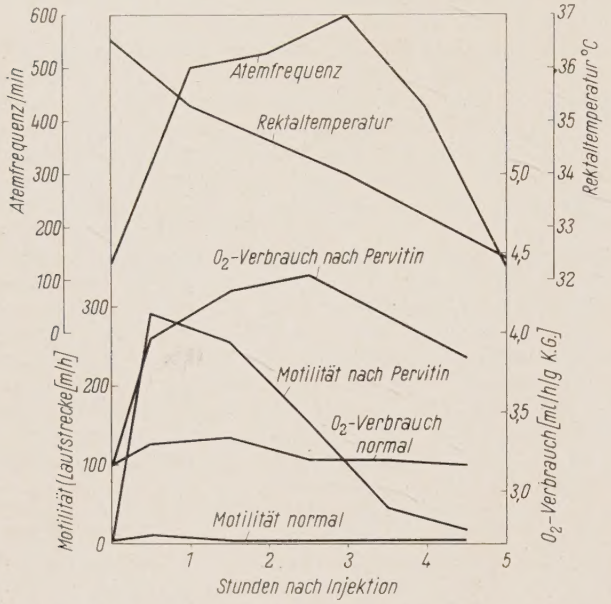


Abb. 1*a*. Mittelwerte der Motilität, Sauerstoffaufnahme, Atemfrequenz und Rektaltemperatur weisser Mäuse ($N = 32$) nach 2–3 μg Pervitin/g subkutan. O_2-Verbrauch reduziert auf 0° C und 760 mm Hg

Azetylcholin ist ein Überträgerstoff innerhalb des Zentralnervensystems. Erregung führt, wie Elliot, Swank und Hunderson[31], sowie Dawson und Richter[1] gezeigt haben, zu einer Zunahme des Azetylcholinverbrauchs im Gehirn. Die Resynthese des Azetylcholins erfolgt unter ATP-Verbrauch. Vielleicht erklärt sich die mit dem Anwachsen der Erregung proportionale Zunahme des ATP im Gehirn teilweise aus dem Umstand, dass es in erhöhtem Masse zur Resynthese des Azetylcholins benötigt wird.

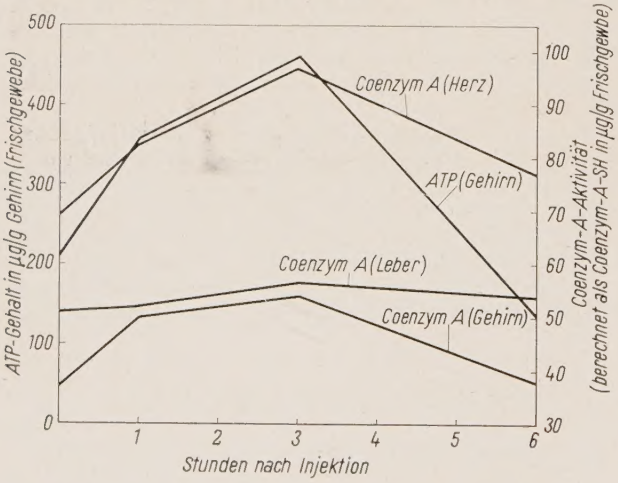


Abb. 1*b*. Mittelwerte der Konzentrationen von ATP im Gehirn ($N = 40$) und Coenzym-A in Gehirn, Herz und Leber ($N = 32$) weisser Mäuse nach 2–3 μg Pervitin/g subkutan.

Die von uns beobachtete, vom Erregungsgrad abhängige Erhöhung der Coenzym-A-Aktivität im Gehirn steht vermutlich im ursächlichen Zusammenhang mit der Zunahme der ATP-Konzentration. Da die zum ATP-Aufbau benötigte Energie bei ausreichender Blut- und Sauerstoffversorgung zum grössten Teil über den oxydativen Abbau der Glukose gewonnen wird, ist das Coenzym A durch die Überführung der beim Abbau der Kohlenhydrate und Fette entstandenen Karbonsäuren in den Zitronensäurezyklus indirekt und durch die Synthese von ATP während der Spaltung von Succinyl-Coenzym A direkt am ATP-Aufbau beteiligt. Andererseits geht der Aufbau des Coenzym A unter Verbrauch von ATP einher, so dass die Zunahme an Coenzym A nur möglich sein dürfte, wenn genügend ATP zur Verfügung steht.

Die Zunahme der Coenzym-A-Aktivität im Herzmuskel ist vermutlich als ein Zeichen der Steigerung des oxydativen Stoffwechsels im Herzen zu bewerten. Die Zunahme der Motilität und Atemfrequenz unter Pervitin erfordert eine erhebliche Mehrleistung des Herzens. Da die ATP-Spaltung als die wesentliche Energiequelle der Kontraktion des Herzmuskels angesehen wird (Szent Györgyi[32]), wird durch die Zunahme an Coenzym A die Geschwindigkeit der oxydativen Phosphorylierungsvorgänge wahrscheinlich beschleunigt und damit die Leistungsfähigkeit des Herzens verbessert. Die Coenzym-A-Aktivität der Leber nimmt im Gegensatz zu Gehirn und Herzmuskel unter Pervitin wenig zu. Die Leber ist funktionell an den durch Pervitin ausgelösten Erregungsprozessen sicher weniger beteiligt als Zentralnervensystem und Kreislauf.

Die durch Pervitinerregung ausgelöste Zunahme des Sauerstoffverbrauchs überdauert, wie Abbildung 1*a* zeigt, die Steigerung der Motilität, Atemfrequenz und die biochemischen Veränderungen im Hirn und Herzmuskel, und zwar um 4–10 h. Die Tiere scheinen während der mehrstündigen Erregungsphase eine grössere Sauerstoffschuld einzugehen, die erst durch eine mehrstündige Sauerstoffnachatmung wieder ausgeglichen werden kann.

Die Zunahme der Atemfrequenz unter Pervitin von 130 auf 500–600/min mag sehr hoch erscheinen. Doch beträgt nach Bänder[33] die Atemfrequenz der frei beweglichen weissen Maus 240–400/min. Sie sinkt erst nach künstlicher Bewegungsbehinderung auf 180–120/min ab.

Ein unerwarteter Befund war die Abnahme der Rektaltemperatur während und nach der durch Pervitin ausgelösten Erregungsphase. Während der Pervitinerregung scheint entweder die zentrale Wärmeregulation durch Pervitin gestört zu sein oder als Folge der Durchblutung- und Atmungssteigerung die Wärmeabgabe die Wärmebildung zu übertreffen.

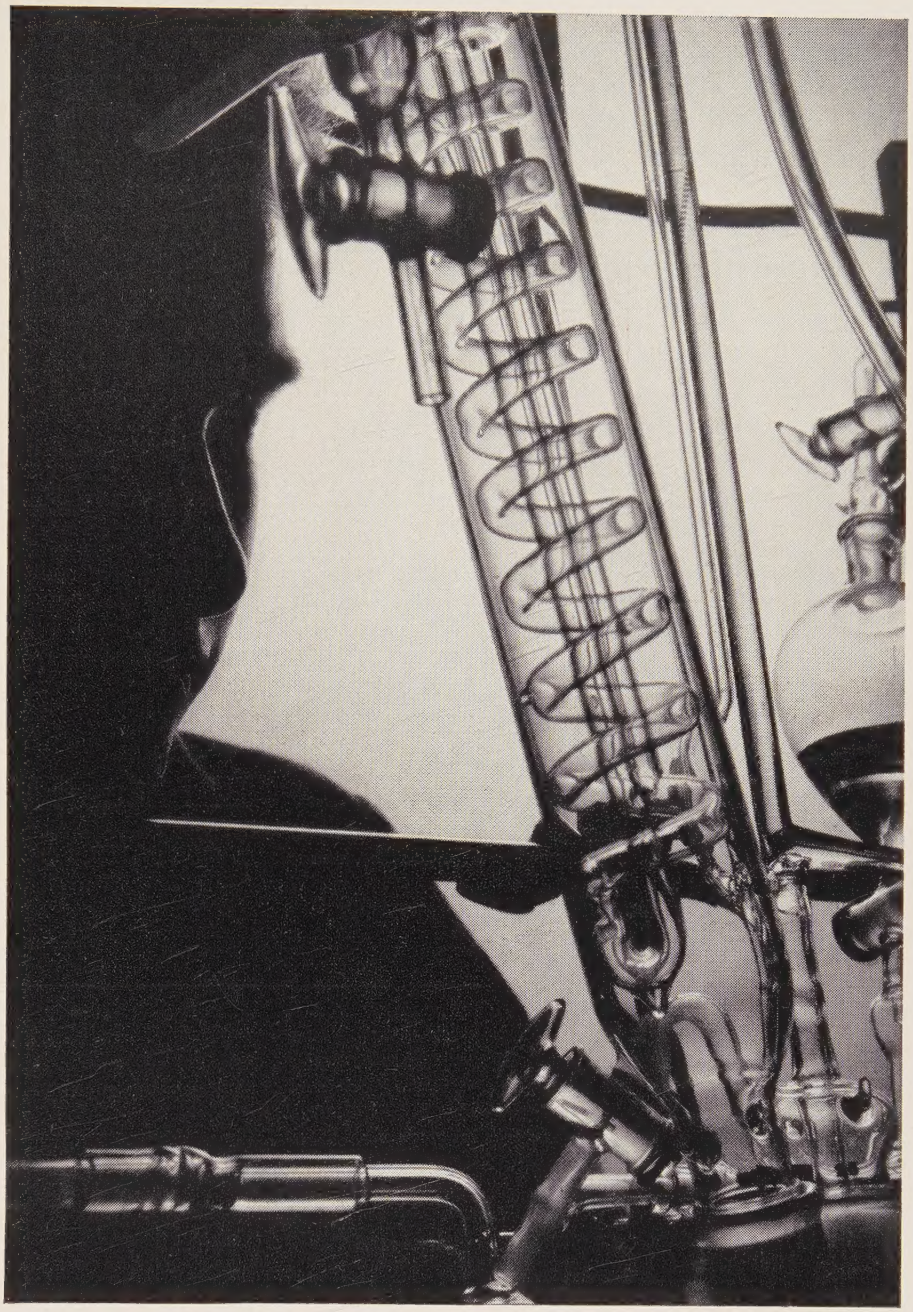
Summary

The ATP- and coenzyme-A-content increases in the brain of white mice during excitation produced by Pervitin (2–3 μg/g bodyweight) proportional to motility, rate of respiration and oxygen-uptake. These facts, observed in this almost physiological excitation, are contrary to the reduction of the energy-rich phosphates in the brain during convulsions.

[31] K. Elliot, R. L. Swank und N. Hunderson, Amer. J. Physiol. *162*, 469 (1950).

[32] A. Szent-Györgyi, *General Views on the Chemistry of Muscle contraction* (S. Karger, Basel-New York 1955).

[33] A. Bänder, Arch. exp. Path. Pharmak. *206*, 619 (1949).



SANDOZ - Präparate

basieren auf eigenen chemischen

und pharmakologischen Forschungen

sowie weltweiter klinischer

Erfahrung.

SANDOZ

Neuerscheinung Experientia Supplementum VI

25 Jahre hochalpine Forschungsstation Jungfraujoch

Broschiert Fr. 8.30.

Herausgeber:
Prof. Dr. A. von Muralt, Bern

Inhalt:

I. Die Hochalpine Forschungsstation Jungfraujoch, von A. von Muralt, Bern.

II. Klimaphysiologische Untersuchungen in der Forschungsstation Jungfraujoch, von A. von Muralt, Bern.

III. Nouvelles recherches astrophysiques et géophysiques à la Station Scientifique du Jungfraujoch, par Daniel Chalonge, Paris.

IV. Die Bedeutung der Forschungsstation auf dem Jungfraujoch für die Erforschung der kosmischen Strahlung, von F. G. Houtermans und M. Teucher, Bern.

V. The Manchester-CERN Cosmic Ray Experiment at the Jungfraujoch, by J. A. Newth and R. Salmeron, Geneva.

VI. Zur Bedeutung der Hochalpinen Forschungsstation Jungfraujoch für die Glaziologie, von R. Haefeli, Zürich.

VII. L'interprétation du spectre solaire observé au Jungfraujoch, par M. Migeotte, Liège, L. Neven, Uccle, et J. Swensson, Cointe-Sclessin.

VIII. Luftelektrische Untersuchungen am Jungfraujoch, von H. Israël, Aachen.

IX. Bibliographie der Arbeiten aus der Forschungsstation.

Bestellungen nimmt Ihr Buchhändler entgegen
Orders through your bookseller
Commandes à votre libraire

Birkhäuser Verlag
Basel und Stuttgart

C. F. von Weizsäcker
Professor für theoretische Physik und für Philosophie an der Universität Hamburg

Zum Weltbild der Physik

siebente, um 10 Aufsätze erweiterte Auflage

Neu aufgenommen wurden: 1. Betrachtungen zu G. B. Vico, Vom Wesen und Weg der geistigen Bildung. 2. Beziehungen der theoretischen Physik zum Denken Heideggers. 3. Entepente und die abstrakte Kunst. 4. Niels Bohr. 5. Säkularisierung und Naturwissenschaft. 6. Die Bedeutung der Logik für die Naturwissenschaft. 7. Komplementarität und Logik. 8. Bemerkungen dazu. 9. Gestaltkreis und Komplementarität. 10. Nachwort, eine Einführung in den Sinn und Inhalt des Buches.

Die Zeit: «. . . Das Tiefste, was in philosophischem Sinne zu der neuen Physik bis jetzt gesagt worden ist, hat C. F. v. Weizsäcker in diesem Buche ausgesprochen.»

Erscheint Anfang Dezember 1957. 380 Seiten. Gr.-8°. Ganzleinen DM 14.–

S. Hirzel Verlag, Stuttgart